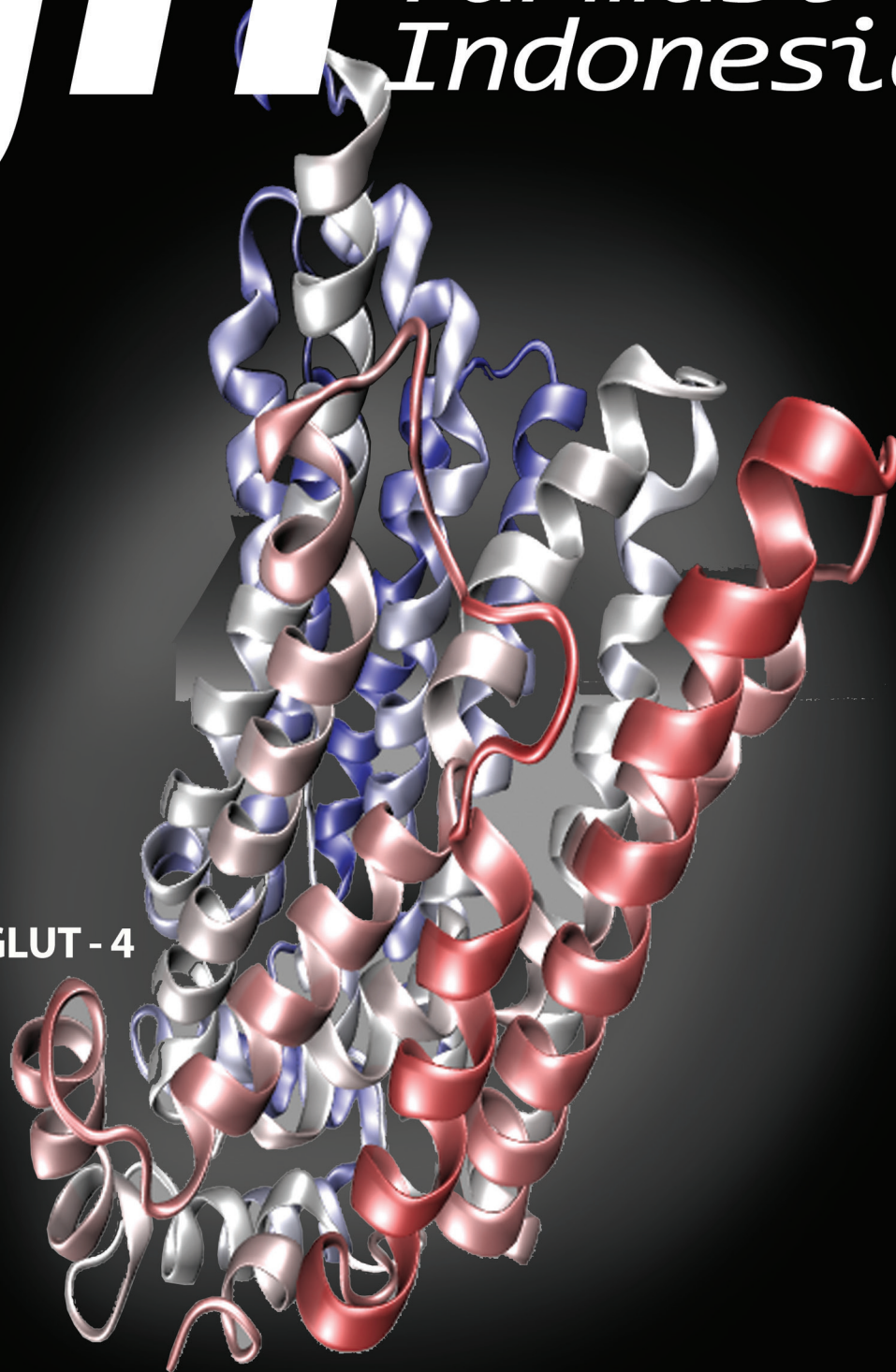


jfi *Jurnal Farmasi Indonesia*

GLUT - 4



VOLUME 6 ❖ NOMOR 2 ❖ JULI 2012

ISSN 1412 - 1107

jfi *Jurnal Farmasi Indonesia*

Diterbitkan oleh Pengurus Pusat

Ikatan Apoteker Indonesia

Terbit 2 kali setahun pada bulan Januari dan Juli

Jurnal Farmasi Indonesia adalah jurnal ilmiah resmi Ikatan Apoteker Indonesia. Isi Jurnal mencakup semua aspek dalam ilmu pengetahuan dan teknologi kefarmasian antara lain farmakologi, farmakognosi, fitokimia, farmasetika, kimia farmasi, biologi molekuler, bioteknologi, farmasi klinik, farmasi komunitas, farmasi pendidikan, dan lain-lain.

Jurnal mengundang makalah ilmiah dari teman sejawat, baik apoteker maupun bukan apoteker yang isinya dapat memacu kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang kefarmasian dan bidang-bidang lain yang berkaitan. Makalah dapat berupa laporan hasil penelitian atau telaah pustaka.

Jurnal Farmasi Indonesia dapat diperoleh di Sekretariat PP IAI atau Redaksi Jurnal Farmasi Indonesia

ISSN: 1412-1107

© Copyright 2012 Ikatan Apoteker Indonesia

Gambar cover oleh: Arry Yanuar

Printing : PT ISFI Penerbitan

Gambar cover:

Adalah GLUT-4 Model: *Sequence* diambil dari NCBI dengan kode akses gi|183296|gb|AAA52569.1| *glucose transporter [Homo sapiens]*. Homologi *modeling* dibuat menggunakan *Swissmodel* dengan template 3GCO. Visualisasi dibuat menggunakan VMD (*Visual Molecular Dynamics*). *Rendering* dan efek visual dibuat menggunakan POV-RAY.

Harga Berlangganan:

Rp. 100.000,- per tahun (2 Nomor)

***Dipersembahkan Untuk Kemajuan
Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kefarmasian
di Indonesia***

**Pemimpin Umum/
Penanggung Jawab**

Drs. M. Dani Pratomo, MM, Apt

Wakil Pemimpin Umum

Drs. Wahyudi U. Hidayat, MSc, Apt

Ketua Dewan Editor

Prof. Dr. Ernawati Sinaga, MS, Apt

Editor Pelaksana

Dr. Christina Avanti MSi, Apt

Anggota Dewan Editor

Prof. Dr. Shirley Kumala, MBiomed, Apt

Prof. Dr. Eddy Meiyanto, Apt

Prof. Dr. Daryono Hadi Tjahono, MSc, Apt

Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra, MS, PhD, Apt

Dr. Umi Athijah, MS, Apt

Dr. Arry Yanuar, MSc, Apt

Raymond R. Tjandrawinata, PhD, MS, MBA

Manajer Administrasi

Dra. Chusun Hamli, MKes, Apt

Manajer Sirkulasi

Drs. Azwar Daris, MKes, Apt

Staf Administrasi dan Sirkulasi

Evita Fitriani, SFarm, Apt

Dani Rachadian, SSos

Siti Kusnul Khotimah, SSos

Desain & layout

Ramli Badrudin

Alamat Redaksi/Penerbit

Jl. Wijayakusuma No.17

Tomang - Jakarta Barat

Telepon/Fax 021- 5671800

jfi@ikatanapotekerindonesia.net

jurnalfarmasiindonesia@gmail.com

online submission website:

jfi.iregway.com

Pengaruh Vanadil Sulfat Terhadap Ekspresi Protein GLUT-4 pada Mencit yang Menderita <i>Diabetes Mellitus</i> Diana Holidah dan Junaidi Khotib	55 - 63
<i>Antiproliferative Activities of Dianella nemorosa Lam. Leaves Methanol Extract Against HCT-116, C2C12 and 293A Cell lines</i> Aditya Krishar Karim, Widya Asmara, Sismindari, Istriyati, dan Tsutomu Nohno	64 - 70
Uji Efek Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Asam Kandis pada Mencit Putih Betina dengan Metode Penetapan Mikronukleus Fatma Sri Wahyuni, Uci Afrina, dan Almahdy A.	71 - 79
Bioaktivitas Ekstrak <i>n</i>-Heksana dan Alkaloida Kasar Kulit Batang <i>Actinodaphne macrophylla</i> (Blume) Nees var <i>angustifolia</i> Koord. & Valetton Tiah Rachmatiah dan Subaryanti	80 - 85
Aktivitas Senyawa Isolasi Daun Surian terhadap Disfungsi Sel Endotel Hiperkholesterolemia Suhatri, Yanwirasti, Dachriyanus, dan Ellyza	86 - 91
Identifikasi Senyawa Antikanker dari Fraksi Kloroform Kulit Batang <i>Bruguiera gymnorhiza</i> dan Aktivitas Sitotoksiknya Warsinah, Sismindari, dan Ratna Asmah Susidarti	92 - 98
Aktivitas Antibakteri dan Antimitotik dari Fungi yang Bersimbiosis dengan Spons Wilmar Maarisit, Marstella Minelko, dan Tan Tjie Jan	99 - 107
Kajian Biodegradasi Film Plastik Campuran Polimer Sintetik dengan Biopolimer dalam Larutan Air Melzi Octaviani, Erizal Zaini, dan Akmal Djamaan	108 - 114
Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Aka Lambuang Yohannes Alen, Rustini, dan Resti Honesty	115 - 121
Petunjuk bagi Penulis	
Instructions for Authors	

Pengaruh Vanadil Sulfat Terhadap Ekspresi Protein GLUT-4 pada Mencit yang Menderita *Diabetes Mellitus*

Diana Holidah¹ dan Junaidi Khotib²

ABSTRACT: The present study was designed to investigate the influence of vanadyl sulphate towards GLUT-4 protein activities in skeletal muscle tissue in streptozotocin-induced diabetic mice. Twenty five mice divided into five groups i.e. placebo group, diabetic group, and three treatment groups based on vanadyl's doses (5, 30 or 100 mg/kg BW, respectively). Diabetic mice model was induced by twice intraperitoneal administration of streptozotocin. The first dose of streptozotocin is 100 mg/kg that were inject in the first day and then dose 50 mg/kg, in the day 14th. Diabetes occurred on 21st day after streptozotocin injection and it was shown by increasing blood glucose level from 151.4 ± 25.1 mg/dL to 237.1 ± 33.0 mg/dL. Administration of vanadyl sulphate at the dose of 5, 30 or 100 mg/kg BW was significantly reduces blood glucose concentration ($p < 0,001$). The muscular tissue were harvested on the day 28th and stained using routine histology staining, hematoxylin-eosin for morphological qualitative analysis and immunohistochemical examination to observe the activities of GLUT-4 protein in skeletal muscle. The results showed that vanadyl sulphate restore atrophic condition of muscular cells and inhibit cell necrosis in muscular tissue. On immunohistochemical examination, vanadyl sulphate might increased the GLUT-4 protein activities in skeletal muscle in streptozotocin-induced diabetic mice.

Keywords: vanadyl sulphate, streptozotocin, diabetes mellitus, GLUT-4

ABSTRAK: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh vanadil sulfat terhadap aktivitas protein GLUT-4 pada otot skelet mencit yang menderita *diabetes mellitus* akibat induksi streptozotocin. Sebanyak 25 ekor mencit dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok kontrol, diabetes dan perlakuan yang diberi vanadil sulfat dengan dosis 5, 30 dan 100mg/kgBB. Keadaan diabetes diinduksi dengan pemberian streptozotocin dosis 100mg/kgBB pada hari pertama dan 50mg/kgBB pada hari ke-14. Pada hari ke-21 terjadi peningkatan kadar glukosa dari $151,4 \pm 25,1$ mg/dL menjadi $237,1 \pm 33,0$ mg/dL. Pemberian vanadil sulfat selama 7 hari akan menurunkan kadar glukosa darah secara signifikan ($p < 0,001$). Otot skelet diambil pada hari ke-28 dan dipreparasi dengan hematoxilin-eosin untuk diamati histologinya dan secara imunohistokimia untuk pengamatan aktivitas protein GLUT-4. Hasil pengamatan menunjukkan pemberian vanadil sulfat akan memperbaiki keadaan atropi dan menghambat nekrosis pada sel otot skelet. Pengamatan secara imunohistokimia menunjukkan bahwa vanadil sulfat dapat meningkatkan aktivitas GLUT-4.

Kata kunci: vanadil sulfat, streptozotocin, diabetes mellitus, GLUT-4

¹ Jurusan Farmasi Klinik dan Komunitas, Fakultas Farmasi Universitas Jember, Jember.

² Jurusan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

Korespondensi:

Diana Holidah

Email: dien_holy@yahoo.com

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus (DM) adalah suatu kelainan yang terjadi akibat gangguan metabolik ditandai dengan peningkatan kadar glukosa dalam darah yang berhubungan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein (1). Jumlah penderita diabetes diproyeksikan meningkat dari 171 juta jiwa pada tahun 2000 menjadi 366 juta jiwa pada tahun 2030. Menurut perkiraan WHO, Indonesia akan menempati peringkat nomor 4 di dunia di bawah India, China dan Amerika Serikat, dengan jumlah pengidap DM sebanyak 21,3 juta jiwa pada tahun 2030 (2).

Berdasarkan etiologinya, DM dibagi menjadi tipe 1 dan tipe 2. Pada pasien DM tipe 1, penyebabnya adalah terjadi kekurangan sekresi insulin secara absolut. Pada penderita DM tipe 2, penyebab utama merupakan kombinasi dari resistensi terhadap insulin dan sekresi insulin yang tidak mencukupi (1,3). Terapi yang diberikan untuk pasien DM tipe 2 adalah *oral antidiabetes drug* (OAD). Walaupun telah diterapi dengan OAD, banyak pasien penderita DM tipe 2 masih sulit mengatur kadar glukosa darahnya dan berkembang menjadi komplikasi yang serius. Efikasi dari OAD dapat diterima dengan baik, tetapi hanya bekerja pada salah satu bagian dari proses patogenesis. Mereka tidak dapat mengembalikan sensitivitas insulin dan fungsi sel β pankreas hingga menjadi normal kembali, akibatnya OAD tersebut tidak dapat mencegah berkurangnya jumlah sel β dan fungsinya hanya bergantung pada jumlah sel β yang ada. Selain itu, OAD digunakan dalam jangka waktu yang panjang sehingga dapat menimbulkan efek samping dan toleransi (4, 5).

Insulin disekresikan dari sel β pankreas sebagai respon terhadap peningkatan konsentrasi glukosa dalam darah. Hormon tersebut akan berikatan dengan reseptornya, sebuah kompleks tetramerik yang terdiri atas dua sub unit α dan dua sub unit β . Ikatan insulin pada sub unit α ekstraseluler memicu perubahan konformasi yang akan mengaktifkan tirosin kinase intrinsik dari sub unit β intraseluler melalui mekanisme autofosfo-

rilasi dari residu tirosin spesifik (6). Tirosin terfosforilasi akan merangsang aktivitas beberapa protein intraseluler dalam jalur *insulin signaling* yang diduga sebagai mediator dari efek metabolik insulin pada transport glukosa, translokasi GLUT-4, sintesis glikogen dan protein. *Insulin signaling* akan berhenti ketika *protein tyrosine phosphatase* (PTPase) mengkatalisis defosforilasi dari reseptor dan substratnya. Pada keadaan resistensi insulin, terjadi peningkatan aktivitas PTPase sehingga *insulin signaling* berlangsung lebih singkat dan tidak dapat memberikan efek metabolik, khususnya terhadap aktivitas *glucose transporter* untuk memasukkan glukosa ke dalam jaringan otot atau lemak (7).

Salah satu senyawa yang diteliti sebagai obat antidiabetes adalah vanadil sulfat. Sebelumnya vanadium sulfat banyak digunakan sebagai suplemen untuk meningkatkan massa otot. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa vanadil sulfat memiliki efektivitas yang tinggi dalam menurunkan kadar gula darah pada mencit yang menderita DM tipe 2 (8). Penelitian ini akan menitikberatkan pada pengaruh vanadil sulfat terhadap aktivitas jalur *insulin signaling*. Parameter yang akan diamati dalam penelitian ini adalah pengaruh vanadil sulfat terhadap aktivitas jalur *insulin signaling* yang dapat dilihat melalui ekspresi GLUT-4 di sel otot skelet. Hasil penelitian ini diharapkan dapat melengkapi hasil penelitian sebelumnya mengenai garam vanadium, sehingga dapat segera dimanfaatkan sebagai salah satu obat pilihan dalam terapi DM.

METODE PENELITIAN

Bahan

Mencit jantan galur Balb-C, usia 8 minggu dengan berat badan 20-30 gram (Laboratorium Hewan Universitas Airlangga), vanadil sulfat (Fluka), streptozotocin (Sigma), dapar sitrat, CMC-Na, eter, paraformaldehid, sukrosa, isopentan, *phosphate-buffered saline* (PBS), *normal donkey serum* (NDS), antibodi GLUT-4 (Santa Cruz biotechnology)

Tabel 1. Kadar Glukosa Darah Setelah Pemberian Streptozotocin

Kelompok	Kadar glukosa darah rata-rata (mg/dL) $\pm$ SD pada hari ke:			
	0	7	14	21
Normal	151,4 $\pm$ 25,1	137,4 $\pm$ 20,7	121,8 $\pm$ 26,7	109,2 $\pm$ 24,1
Diabetes	151,4 $\pm$ 25,1	171,4 $\pm$ 38,8	176,2 $\pm$ 25,9	237,1 $\pm$ 33,0 ^a

^a berbeda signifikan dengan kadar glukosa darah hari ke-0 ($p < 0,001$)

Alat

Mikroskop cahaya (Olympus AX-70), kamera digital, mikrotom, alat pemeliharaan hewan, alat bedah, dan alat gelas.

Metode

a. Perlakuan Pada Hewan Coba

Pada hari pertama mencit diberikan injeksi streptozotocin 100 mg/kg dalam pembawa dapar sitrat secara intraperitoneal untuk menginduksi terjadinya *diabetes mellitus*. Pada hari ke-14, diberikan injeksi kedua streptozotocin dengan dosis 50 mg/kg. Pada hari ke-21, suspensi vanadil sulfat diberikan secara peroral kepada kelompok perlakuan dengan dosis 5, 30, dan 100 mg/kg sekali sehari selama 7 (tujuh) hari. Glukosa darah dievaluasi pada hari ke-0, 7, 14, 21 dan 28 untuk mengetahui efek induksi streptozotocin dan pemberian vanadil sulfat terhadap glukosa darah mencit. Sampel darah diambil melalui ekor dengan cara melukai ekor. Kadar glukosa darah diukur dengan menggunakan *On Call Plus Blood Glucose Monitoring System*. Pada hari ke-28, setelah pengukuran glukosa darah, mencit dikorbankan dan dilakukan pembedahan untuk mengambil jaringan otot (8).

b. Preparasi Hematoxylin-Eosin

Jaringan otot tungkai belakang difiksasi dalam *neutral buffered formalin* 10%. Setelah itu jaringan dicuci dengan *xylene*, direndam dalam parafin dan dipotong dengan mikrotom setebal 4-5 μ m dan diletakkan pada gelas obyek. Tahap awal pewarnaan jaringan otot dengan *periodic acid*

Schiff adalah proses deparafinasi dengan cara mengalirkan aquadest pada potongan jaringan. Setelah itu potongan jaringan direndam dalam asam periodat selama 5 menit dan dibilas dengan aquadest. Ditambahkan reagen Schiff pada suhu kamar, dibiarkan selama 30 menit, kemudian dipanaskan dengan *microwave* tenaga tinggi selama 45-60 detik hingga berwarna magenta tua. Dibilas dengan air mengalir selama 5 menit kemudian diberi *hematoxylin* sebagai *counterstain* selama 3 menit, dicuci dengan air, *hematoxylin* biru dan aquadest. Tahap terakhir adalah dehidrasi potongan jaringan dengan alkohol, dibersihkan dan ditutup dengan gelas penutup. Potongan jaringan otot mencit siap dianalisis.

c. Preparasi Imunohistokimia

Preparasi pewarnaan imunohistokimia dilakukan dalam 6 tahap. Tahap pertama adalah deparafinasi preparat dalam larutan xilol. Tahap kedua adalah *blocking peroxidase endogenous* dengan cara dimasukkan dalam H₂O₂ 0,3% dalam methanol r.p. atau *dokocytomation (peroxidase blocking reagent S200/30-2)* pada suhu kamar selama 5 menit dan kemudian dibilas dengan aquadest selama 5 menit. Tahap ketiga merupakan tahap *antigen retrieval* yang dilakukan dengan cara menghangatkan *target retrieval solution* (TRS)/buffer sitrat dalam kontainer pada *microwave* dengan posisi "high" selama 2 menit, kemudian preparat dimasukkan dalam container buffer sitrat yang hangat dan dimasukkan kembali ke dalam *microwave*. Kemudian, larutan TRS/buffer sitrat didinginkan pada suhu kamar, dicuci

Tabel 2. Kadar Glukosa Darah pada Hari ke-28, Setelah Pemberian berbagai Dosis Vanadil Sulfat

Kelompok	Kadar glukosa darah rata-rata (mg/dL) $\pm$ SD
Normal	109,2 $\pm$ 24,1
Diabetes	237,1 $\pm$ 33,0 ^c
VS 5mg/kgBB	172,0 $\pm$ 19,8 ^{ac}
VS 30mg/kgBB	142,6 $\pm$ 4,2 ^{ac}
VS 100mg/kgBB	106,8 $\pm$ 8,2 ^{ab}

^a berbeda signifikan dengan kelompok diabetes^b tidak berbeda signifikan dengan kelompok normal^c berbeda signifikan dengan kelompok normal

menggunakan larutan buffer TRIS/tween 20 selama 5 menit, setelah itu dilakukan *marking pen-immunologic* di sekeliling sayatan jaringan sesuai kebutuhan. Tahap keempat adalah *blocking background* dengan cara meneteskan protein *block serum free* di sekitar *area marking pen immunologic* pada suhu kamar. Tahap kelima adalah pewarnaan utama. Caranya adalah dengan meneteskan antibodi primer dalam *marking area* dan diinkubasi dalam *magnetic immunostaining* dengan keadaan tertutup, cuci dengan buffer TRIS/tween 20, kemudian diteteskan antibodi sekunder (Biotinlabelled Link) pada *marking area* pada suhu kamar. Tahap terakhir yaitu *counterstain*, dilakukan dengan cara memasukkan preparat dalam MEYER'S *haematoxylin*, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dilakukan dehidrasi dengan cara dicelupkan dalam alkohol dengan konsentrasi meningkat.

d. Analisis Data

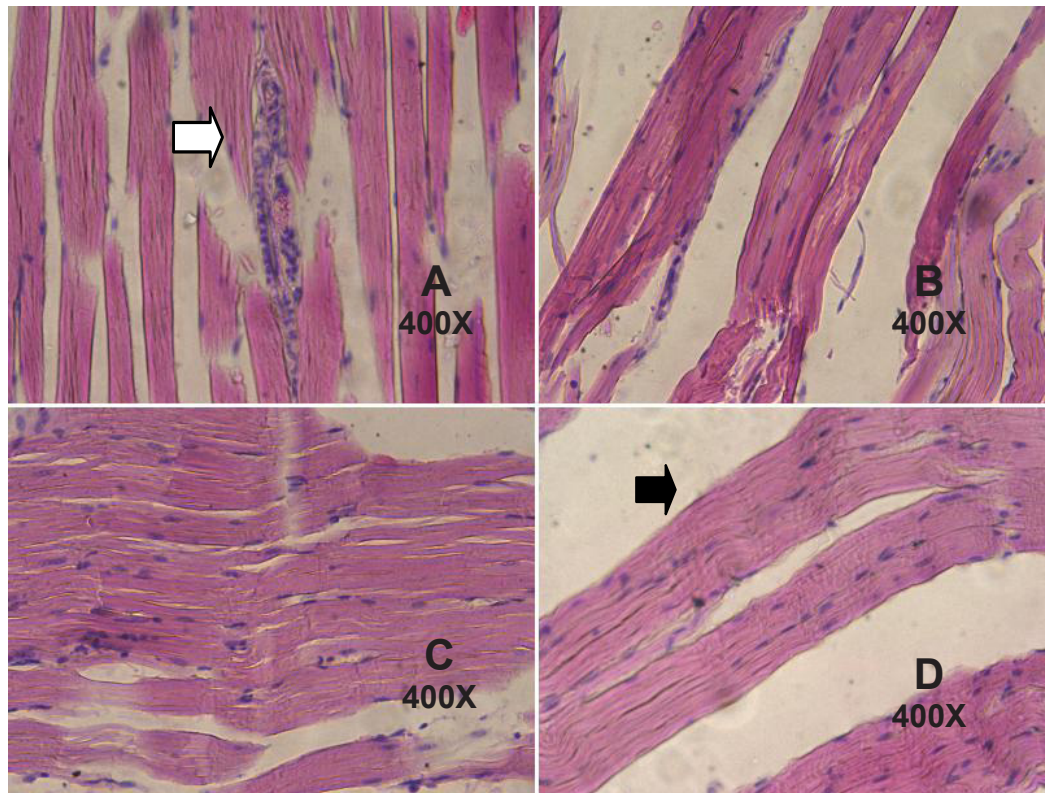
Data kadar glukosa darah yang diperoleh akan dianalisis menggunakan metode analisis statistik ANOVA satu arah. Preparat jaringan otot yang diwarnai dengan HE, akan diamati keadaan histologinya. Diameter serat otot diukur dan hasil yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA. Sementara preparat yang dipreparasi secara imunohistokimia akan diamati intensitas warna yang dihasilkan, yang menggambarkan aktivitas GLUT-4, dan dihitung jumlah sel yang mengekspresikan GLUT-4.

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Kadar glukosa darah mencit

Perubahan kadar glukosa darah pada mencit yang diberi injeksi intraperitoneal streptozotocin tampak pada tabel 1.

Pada kelompok kontrol tidak terjadi peningkatan kadar glukosa darah acak dari hari ke-0 sampai hari ke-21. Pada kelompok mencit yang mendapatkan injeksi streptozotocin, pengukuran kadar glukosa darah pada hari ke-7 dan 14 tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan jika dibandingkan dengan kadar glukosa darah pada hari ke-0 ($p = 0,142$ dan $p = 0,052$) dan belum mencapai kadar glukosa darah diabetes yaitu lebih dari 200 mg/dL, sehingga harus diberikan streptozotocin yang kedua dengan dosis 50mg/kgBB pada hari ke-14. Pengukuran kadar glukosa darah setelah pemberian streptozotocin yang kedua menunjukkan peningkatan yang signifikan dari 151,4 $\pm$ 25,1 mg/dL pada hari ke-0 menjadi 237,1 $\pm$ 33,0 mg/dL pada hari ke-21 ($p < 0,001$). Efek toksik streptozotocin disebabkan oleh kemampuan alkilasi yang berhubungan dengan struktur kimianya yang merupakan analog metil nitrosourea, terutama pada posisi O⁶ dari guanin. Hipotesis lain menyebutkan efek diabetogenik streptozotocin berhubungan dengan kemampuannya berperan sebagai donor *nitric oxide* (NO) intraseluler. Streptozotocin bukan merupakan donor NO spontan tetapi harus dimetabolisme dahulu di dalam sel sehingga dapat



Gambar 1. Irisan Membujur Jaringan Otot Skelet Mencit dengan Pewarnaan HE. (A) Diabetes (B) Diabetes+Vanadil Sulfat 5mg/kgBB (C) Diabetes+Vanadil Sulfat 30mg/kgBB (D) Diabetes+Vanadil Sulfat 100mg/kgBB. Pembesaran 400x

Tabel 3. Diameter Rata-Rata Serat Otot Mencit

Kelompok	Diameter rata-rata serat otot (μm) $\pm$ SD
normal	96,212 $\pm$ 21,995
diabetes	34,571 $\pm$ 11,511 ^a
VS 5mg/kgBB	61,358 $\pm$ 19,140 ^b
VS 30mg/kgBB	66,596 $\pm$ 21,142 ^b
VS 100mg/kgBB	90,349 $\pm$ 35,005 ^{bc}

^a berbeda signifikan dengan normal ($p < 0,001$)

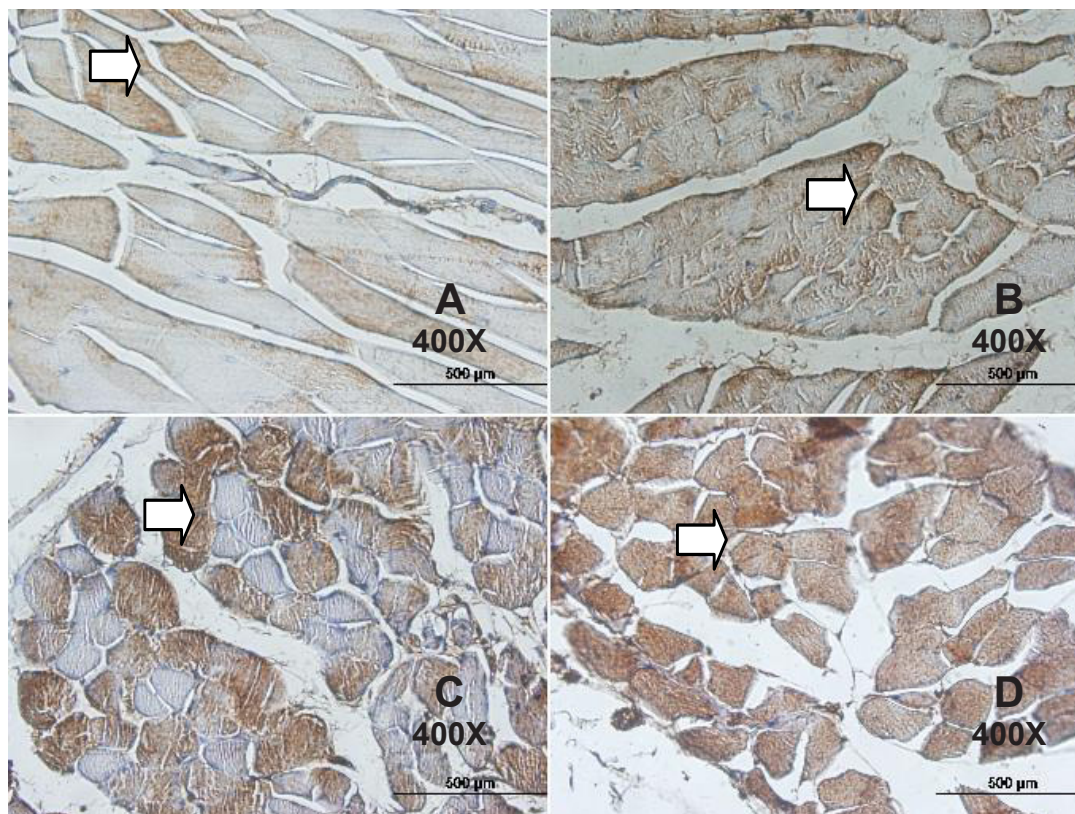
^b berbeda signifikan dengan diabetes ($p = 0,013$; $p = 0,003$; $p < 0,001$)

^c tidak berbeda signifikan dengan normal ($p = 0,572$)

melepaskan molekul NO yang selanjutnya dapat menyebabkan kerusakan DNA sel β pankreas. Akibatnya produksi insulin terganggu dan jumlah insulin yang dihasilkan berkurang, dan kerusakan sel β pankreas yang dihasilkannya bertambah berdasarkan waktu serta penambahan dosis streptozotocin (9, 10).

Setelah diperoleh sekelompok mencit dengan

keadaan DM pada hari ke-21, maka mencit-mencit tersebut dibagi menjadi 4 kelompok. Satu kelompok merupakan mencit dengan keadaan DM yang mendapatkan pemberian larutan pembawa yaitu CMC Na. Sementara mencit lainnya dibagi menjadi 3 kelompok yang akan mendapatkan pemberian vanadil sulfat dalam pembawa CMC Na 0,6% dengan dosis masing-masing 5mg/kgBB,



Gambar 2. Ekspresi GLUT-4 pada Sel Otot Skelet Mencit (A) Diabetes (B) Diabetes+Vanadil Sulfat 5mg/kgBB (C) Diabetes+Vanadil Sulfat 30mg/kgBB (D) Diabetes+Vanadil Sulfat 100mg/kgBB. Menggunakan Antibodi GLUT-4. Pembesaran 400x

30mg/kgBB dan 100mg/kgBB. Perlakuan diberikan setiap hari selama 7 hari. Pada hari ke-28 kadar glukosa darah acak mencit diukur dan hewan dikorbankan untuk diambil otot skeletnya. Hasil pengukuran kadar glukosa darah acak mencit tercantum pada tabel 2.

Pemberian vanadil sulfat dosis 5, 30 dan 100 mg/kgBB selama 7 hari akan menurunkan kadar glukosa darah secara signifikan jika dibandingkan dengan kelompok diabetes, bahkan pemberian vanadil sulfat dosis 100mg/kgBB menyebabkan penurunan glukosa darah hingga tidak berbeda secara signifikan dengan kadar glukosa darah mencit normal.

b. Gambaran histologi jaringan otot skelet mencit

Keadaan DM akan mempengaruhi morfologi jaringan pada organ target insulin yang merupakan tempat penyimpanan glukosa, diantaranya adalah otot skelet. Pada irisan membujur

otot skelet mencit yang menderita DM tampak perubahan pada diameter rata-rata serat otot yang menurun secara signifikan ($p = 0,01$) dari $96,212 \pm 21,995 \mu\text{m}$ pada keadaan normal menjadi $34,571 \pm 11,511 \mu\text{m}$ pada keadaan DM. Hal tersebut menunjukkan telah terjadi atropi pada sel otot. Perubahan lain yang tampak terutama adalah perubahan pada inti sel otot. Pada keadaan DM, inti sel tampak memiliki warna yang pucat, terjadi pembengkakan inti sel serta bergabungnya beberapa inti sel di dalam sitoplasma yang menandakan terjadinya proses nekrosis sel otot ($\square$).

Gambar 1 menunjukkan perubahan yang terjadi pada serabut otot skelet mencit dari kondisi DM dan setelah mendapat perlakuan vanadil sulfat dosis 5, 30 dan 100 mg/kg selama 7 hari. Hasil ini menunjukkan perbaikan atropi sel otot skelet yang terjadi pada kondisi DM. Inti sel yang tampak di jaringan otot skelet kelompok perlakuan terlihat tajam dan jelas, tidak lagi menunjukkan

Tabel 4. Jumlah Sel yang Mengekspresikan GLUT-4 per Lapang Pandang

Kelompok	Jumlah sel (Rata-rata $\pm$ SD)
Normal	36 $\pm$ 9
Diabetes	16 $\pm$ 3
VS 5mg/kgBB	25 $\pm$ 9
VS 30mg/kgBB	28 $\pm$ 11
VS 100mg/kgBB	35 $\pm$ 10

tanda-tanda nekrosis sel otot seperti yang terlihat pada kelompok DM (seperti ditunjukkan tanda  pada gambar 1). Pada jaringan otot skelet mencit penderita DM yang mendapat pemberian vanadil sulfat terjadi penambahan volume sel, yang tampak dari makin besarnya diameter serat otot jika dibandingkan dengan kelompok mencit yang menderita DM (A).

Pada tabel 3, diameter rata-rata serat otot pada mencit dengan pemberian vanadil sulfat dosis 5, 30 dan 100 mg/kgBB meningkat secara signifikan dari $34,571 \pm 11,511 \mu\text{m}$ pada keadaan DM menjadi masing-masing sebesar $61,358 \pm 19,140 \mu\text{m}$ ($p = 0,013$), $66,596 \pm 21,142 \mu\text{m}$ ($p = 0,003$) dan $90,349 \pm 35,005 \mu\text{m}$ ($p < 0,001$). Peningkatan diameter rata-rata serat otot mencit terjadi karena pemberian VS akan memperbaiki proses *uptake* glukosa pada otot skelet dengan cara menstimulasi transport glukosa dan sintesis glikogen. Hasil tersebut sesuai dengan hasil penelitian lain yang menyebutkan bahwa pemberian vanadium dan insulin pada tikus diabetes akan memperbaiki aktivitas *protein phosphatase-1* (PP1) pada jaringan otot. PP1 sendiri merupakan enzim regulator yang berperan dalam perkembangan diabetes dan sintesis glikogen (11).

c. Ekspresi protein GLUT-4 pada otot skelet mencit

Aktivitas *insulin signaling pathway* dalam penelitian ini diamati melalui ekspresi dari *glucose transporter 4* (GLUT-4) yang merupakan protein

yang berperan dalam proses *signaling*. Dalam penelitian ini digunakan metode imuno-histokimia, dimana irisan jaringan akan di *staining* dengan menggunakan antibodi yang sesuai, dalam hal ini antibodi GLUT-4. Antibodi yang digunakan adalah antibodi GLUT-4 produksi Santa Cruz Biotechnology, Inc yang diencerkan 1:300. Setelah direaksikan dengan enzim peroksidase akan diperoleh hasil positif berupa perubahan warna menjadi coklat. Warna tersebut yang akan diamati dibawah mikroskop cahaya.

Gambar 2 merupakan hasil pengamatan ekspresi protein GLUT-4 pada sel otot skelet. Ekspresi protein GLUT-4 digambarkan dengan warna coklat seperti ditunjukkan oleh tanda (). Pada sel otot skelet mencit normal, GLUT-4 diekspresikan cukup kuat pada hampir semua sel dan tampak ekspresi yang lebih kuat lagi pada daerah membran sel. Sementara pada sel otot skelet mencit yang menderita DM, GLUT-4 diekspresikan dengan lemah. Hal ini menunjukkan bahwa keadaan DM akan menurunkan densitas dan jumlah protein GLUT-4 pada sel otot skelet. Mencit yang menderita DM selanjutnya diberikan perlakuan dengan vanadil sulfat. Jika dibandingkan dengan mencit DM, ekspresi protein GLUT-4 tampak lebih kuat pada sel otot skelet pada mencit yang diberikan vanadil sulfat dan ekspresinya semakin kuat dengan bertambahnya dosis vanadil sulfat yang diberikan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa vanadil sulfat akan meningkatkan densitas dan jumlah protein GLUT-4 pada sel otot mencit yang menderita DM.

Analisis juga dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel pada otot skelet yang mengekspresikan protein tersebut. Penghitungan dilakukan dalam 10 lapang pandang yang berbeda pada pembesaran 400x. Hasil penghitungan jumlah sel yang mengekspresikan protein GLUT-4 tampak dalam tabel 4.

GLUT-4 terekspresi dengan lebih kuat pada mencit yang mendapatkan VS dibandingkan dengan mencit yang menderita DM. Semakin tinggi dosis VS yang diberikan, semakin kuat protein GLUT-4 yang diekspresikan. Hasil penelitian tersebut dapat dijelaskan sebagai akibat kerja Vanadium pada jalur *insulin signaling* yang bekerja dengan cara menghambat aktivitas PTPase. Vanadium sebagai analog fosfat akan masuk ke dalam sel melalui difusi, endositosis, atau *phosphate channels* (P/VCh) dan berikatan dengan sisi aktif dari enzim PTPase dan menghambat aktivitas PTPase. Penghambatan aktivitas PTPase yang meru-

pakan regulator negatif dalam proses *signaling* akan menyebabkan tirosin terfosforilasi tetap aktif sehingga aktivitas beberapa protein intraseluler dalam jalur *signaling* insulin bertahan lebih lama. Jika *insulin signaling* masih aktif dan GLUT-4 masih terdapat di membran plasma sel target insulin, maka proses *uptake* glukosa dari sirkulasi sistemik menuju sel target akan terus berlangsung dan kadar glukosa dalam darah akan turun (12,13,14,15).

KESIMPULAN

Pemberian vanadil sulfat akan meningkatkan ekspresi dan aktivitas protein GLUT-4 pada sel otot mencit yang menderita *diabetes mellitus* sehingga proses pemasukan glukosa ke dalam sel otot terus berlangsung dan kadar glukosa darah akan turun.

DAFTAR PUSTAKA

- Schwinghammer TL. (Ed.). Diabetes Mellitus. In: Wells BG, Dipiro JT, Schwinghammer TL., Hamilton CW. (Eds.). Pharmacotherapy Handbook, ed. 6th, USA: Appleton and Lange; 2003.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes. Diabetes Care. 2004. 27(5): 1047-1053
- Nolte, MS, Karam JH. Hormon Pankreas dan Obat Anti Diabetes. In: B.G. Katzung (Ed.). Farmakologi: Dasar dan Klinik, edisi 8, Jakarta: Salemba Medika; 2001: 671 – 705
- Bailey CJ. Potential New Treatment for Type 2 Diabetes. TiPS. 2000. 21: 259-26
- Balasubramanyam M, Mohan V. Orally Active Insulin Mimics: Where do We Stand Now?. Journal of Bioscience. 2001. 26 (3): 383-390
- Asante-Appiah E., Kennedy BP. Protein Tyrosine Phosphatases: the Quest for Negative Regulators of Insulin Action. American Journal Physiology Endocrinology Metabolism. 2003. 284: 663 – 70
- Goldstein BJ. Protein phosphatases: Emerging Targets for Therapeutic Intervention in Type 2 Diabetes and Related States of Insulin Resistance. J Clin Endocrinol Metab. 2002. 87 (6): 2474-2480
- Hasmono D, Ariyanto AN, Khotib, J. Peran Tirosin Fosfatase pada Penurunan Glukosa Darah Mencit (Mus musculus) yang Menderita Diabetes Mellitus tipe 2. Majalah Farmasi Airlangga. 2005. 5(2)
- Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. Physiol Res. 2001. 50: 536-46
- Lenzen S. The Mechanisms of Alloxan and Streptozotocin Induced Diabetes. Diabetologia. 2008. 51: 216-226
- Semiz S, Orvig C, McNeill J. Effect of Diabetes, Vanadium and Insulin on Glycogen Synthase Activation in Wistar Rat. Mol Cell Biochem. 2002. 231: 23-35
- Verma S, Cam MC, McNeill JH. Nutritional Factors that Can Favorably Influence the Glucose/ Insulin System: Vanadium. J Am Coll Nutr. 1998.17(1): 11 – 18

13. Srivastava AK, Mehdi MZ. Insulinomimetic and Anti-diabetic Effects of Vanadium Compounds. *Diabet Med.* 2004; 22: 2-13
14. Tracey Alan S, Gail R. Willsky, Esther S, Takeuchi. Vanadium : chemistry, biochemistry, pharmacology, and practical applications USA: Taylor & Francis Group LLC; 2007
15. Rehder D. Bioinorganic Vanadium Chemistry ISBN: 978-0-470-06509-9 USA: John Wiley & Sons, Ltd; 2008.

Antiproliferative Activities of *Dianella nemorosa* Lam. Leaves Methanol Extract Against HCT-116, C2C12 and 293A Cell lines

Aditya Krishar Karim^{1,2}, Widya Asmara³, Siswindari⁴, Istriyati¹, Tsutomu Nohno⁵

ABSTRACT: *Dianella nemorosa* Lam. (Liliaceae) is a medicinal plant traditionally used in Papua for treatment of cancer, injury, fracture, inflammation and also for antiseptic. The aim of this study was to evaluate antiproliferative activities of methanol extract of *D. nemorosa* leaves against HCT-116 (colorectal cell line), C2C12 (adherent mouse myoblast cell line) and 293A (primary embryonal human kidney transformed with human adenovirus type 5 DNA). Powder of leaves was extracted using methanol. Antiproliferative activities were determined by cell proliferation reagents WST-1 assay for 1h, 2h, and 4h after 72h incubation. The result showed that methanol extract of *D. nemorosa* leaves showed remarkable antiproliferative activities against HCT-116 cell line with IC₅₀ values of 199.31 µg/ml (1h), 197.87 µg/ml (2h) and 161.12 µg/ml (4h). The activities against C2C12 cell line resulted in the IC₅₀ values of 405.51 µg/ml (1h), 435.12 µg/ml (2h) and 394.38 µg/ml (4h), while the IC₅₀ values for 293A cell line were 580.81 µg/ml (1h), 442.21 µg/ml (2h) and 366.74 µg/ml (4h), respectively. Those results indicated that methanol extract of *D. nemorosa* leaves possess potential antiproliferative activities against HCT-116, C2C12 and 293A cell lines. Further study is necessary to investigate the inhibitory mechanism of methanol extract of *D. nemorosa* leaves on HCT-116, C2C12, and 293A cell lines.

Keywords : *Dianella nemorosa* Lam, cancer cell, HCT-116, C2C12, 293A

ABSTRAK: *Dianella nemorosa* Lam. (Liliaceae) adalah salah satu jenis tumbuhan yang secara tradisional di Papua digunakan untuk pengobatan kanker, luka, inflamasi dan juga sebagai antiseptik. Penelitian ini bertujuan menguji aktivitas antiproliferatif ekstrak metanol dari daun *D. nemorosa* terhadap sel kanker HCT-116 (colorectal cell line), C2C12 (adherent mouse myoblast cell line) dan 293A (primary embryonal human kidney transformed with human adenovirus type 5 DNA). Serbuk daun diekstraksi dengan menggunakan metanol. Aktivitas antiproliferatif diuji dengan menggunakan uji reagen proliferasi WST-1 selama 1, 2 dan 4 jam setelah inkubasi 72 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun *D. nemorosa* memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap sel kanker HCT-116 dengan nilai IC₅₀ sebesar 199.31 µg/ml (1jam), 197.87 µg/ml (2jam) dan 161.12 µg/ml (4h), untuk sel kanker C2C12 IC₅₀ sebesar 405.51 µg/ml (1jam), 435.12 µg/ml (2jam) dan 394.38 µg/ml (4jam), sedangkan sel kanker 293A nilai IC₅₀ sebesar 580.81 µg/ml (1jam), 442.21 µg/ml (2jam) dan 366.74 µg/ml (4jam). Dari hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa ekstrak metanol daun *D. nemorosa* memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap sel kanker yang diuji. Penelitian lanjutan masih diperlukan untuk mengetahui mekanisme penghambatan pada sel kanker HCT-116, C2C12 dan 293A.

Kata kunci : *Dianella nemorosa* Lam, sel kanker, HCT-116, C2C12, 293A

¹ Department of Biology, Faculty of Biology UGM Yogyakarta, Indonesia

² Department of Biology, Faculty of Science and Mathematic, Universitas Cenderawasih, Papua, Indonesia

³ Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine UGM, Yogyakarta, Indonesia

⁴ Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy UGM, Yogyakarta, Indonesia

⁵ Department Molecular and Development Biology, Kawasaki Medical School, Jepang

Korespondensi:

Aditya Krishar Karim

Email : krisharkarim@yahoo.com

INTRODUCTION

Cancer or malignant disease is one of the major causes of death in humans. The malignant neoplasm is the third (12.4%) leading cause of death worldwide. The first (30%) being cardiovascular disease, and the second (18.8%) being infectious diseases, which include HIV/AIDS. The total number of cases of cancer in 2000 to 2020 is estimated to increase by 73% in the developing countries (1,2).

Plants may be an alternative to currently used anticancer agents, because they are a rich source of bioactive compounds. Since many of them are largely free from adverse effects and have excellent pharmacological actions. The plants are rich in a wide variety of secondary metabolites such as tannins, terpenoids, alkaloids, flavonoids, and phenolic compounds, which have been screened and indicated anticancer, antioxidant, antiinflammatory, and antimicrobial activity (3,4,5,6,7).

Plants from tropical regions such as medicinal plant from Papua region are considered to be one of the potential sources for the screening of anticancer agents. In West Papua and Papua, it has been estimated may be contains 20.000-25.000 species of plant and only little of this species used for medicinal plant. Some of Papua medicinal plants remain to be assessed for possible cytotoxic activities such as *Phaleria macrocarpa*, *Pandanus conoideus*, and *Myrmecodia pendans* (8,9,10,11).

In Papua, most of the research activities in natural products are still limited to the inventory of herbal medicine information and utilization of various plants and trees, meaning that obtaining scientific proof for their biological activities are still challenging and need more investigation. One of the medicinal plants is *D. nemorosa* Lam. which might be potential for new source of anticancer agent. This plant is commonly known as Tegari, and has local name in Papua is *Pra Kepey* referred to as *War Plant* and members of Liliaceae family (12,13).

This plant grown on tropical areas and produces beautiful flowers with a variety of colours such

as blue, purple and white, and commonly planted for ornament and decorative purpose. Scientific publication on *D. nemorosa* is still difficult to obtain and generally only discussing about its taxonomy and ethnobotany. This plant is one of most common medicinal plants used by local community in Tablasupa village, Papua. *D. nemorosa* has been used as an alternative treatment for control of cancer, injury, fracture, inflammation, various of skin diseases and also was used as an antiseptic. Some species of *Dianella* extracts have potential to be developed as anticancer agent. Methanol extract of *D. nemorosa* leaves contains alkaloid, terpenoid, phenolic compounds and shown that it inhibition in HeLa cell line using MTT assay (14).

Other study reported that several classes of compounds have been isolated and identified including naptoquinone, stypanrol, saponin, plum-bagin, poliphenolic, and alkaloid from different species of *Dianella* and have shown a wide variety of pharmacological activities, such as antimicrobial, anticancer, antitumor and antiinflammatory activities (15,16,17,18).

Herbal medicine have long been used traditionally to prevent and treat many disease including cancer and thus they are good candidates for the development of anticancer agent. Current estimates suggest that, in many developing countries, a large proportion of the population relies heavily on traditional practitioners and medicinal plants to meet primary health care needs. Although modern medicine may be available in these countries, herbal medicines have often maintained popularity for historical and cultural reasons. Concurrently, many people in developed countries have begun to turn to alternative or complementary therapies, including medicinal herbs (19, 20).

To our knowledge, a few recorded data for clinical study or for biological activity of *D. nemorosa* Lam. against human cell line. Here, we have attempted to evaluate the antiproliferative activities of *D. nemorosa* leaves methanol extract from Papua against HCT-116, C2C12 and 293A cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of *D. nemorosa* extract

D. nemorosa plant was collected from the Tablasupa village-Sentani, Papua. The plant was identified by Taxonomy Laboratory, Gadjah Mada University and Botany Laboratory-Herbarium, Indonesian Institute of Science (LIPI). The leaves are washed, dried and chopped finely using a blender. Five hundred grams of dried material were exhaustively extracted with methanol maseration. The Methanol extract was filtered and concentrated using a rotary evaporator and the evaporated do dryness.

Preparation of cell line

HCT-166 cell line obtained from Clinical Oncology Laboratory stock of Kawasaki Medical School, Japan. HCT-116 cell line was grown on McCoy'S 5A medium (Gibco) containing 10% v/v Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma) and presence of 1% w/v of Penicillin-streptomycin (Sigma). C2C12 and 293A line was obtained from Laboratory stock of Department Molecular and Developmental Biology, Kawasaki Medical School, Japan. C2C12 was grown on DMEM (Sigma) medium containing 10% v/v Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma) and 1% v/v kanamicin (Sigma), and 293A cell line on complete medium containing 10% Fetal bovine serum (FBS), 2mM L glutamine (Gibco), Amino acids (NEAA) (Gibco) and presence of 1%w/v of penicillin-streptomycin (Sigma). The cultures were maintained at 37°C in humidified atmosphere of 5% CO₂.

In vitro assay for antiproliferative activities

The cell suspension 4.0×10^3 cell/ml (100µl) was plated into 96 well microplate (Nunc, Germany) and treated with different concentration of methanol extract *D. nemorosa* leaves, in a serial dilution (500, 250, 125, 62.50, 31.25 dan 15.625, 7.8125 µg/ml). Following treatment, plates were incubated in CO₂ incubator at 37°C for 72h. Medium removed by aspirator and add medium with 10 µl cell proliferation reagent WST-1 for

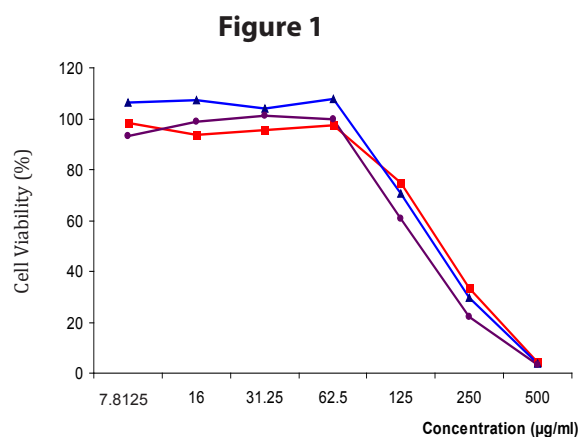


Figure 1. Effect of methanol extract of *D. nemorosa* leaves (µg/ml) on the viability of HCT-116 cell line (%). Antiproliferative activities was measured after incubation for 72h at 37°C with 5% CO₂, and after add WST-1 reagent for 1h (■), 2h (▲) and 4h (●).

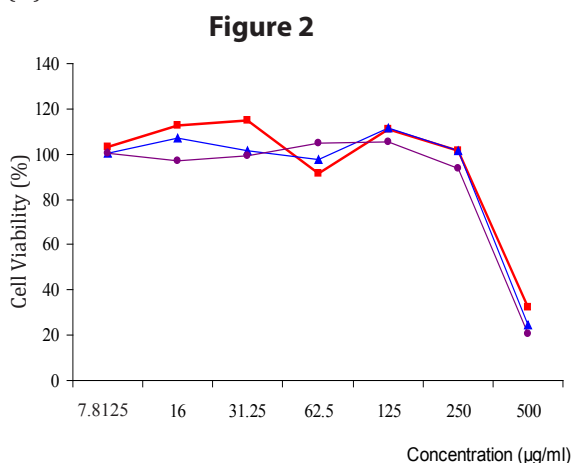


Figure 2. Effect of methanol extract of *D. nemorosa* leaves (µg/ml) on the viability of C2C12 cell line (%). Antiproliferative activities was measured after incubation for 72h at 37°C with 5% CO₂, and after add WST-1 reagent for 1h (■), 2h (▲) and 4h (●).

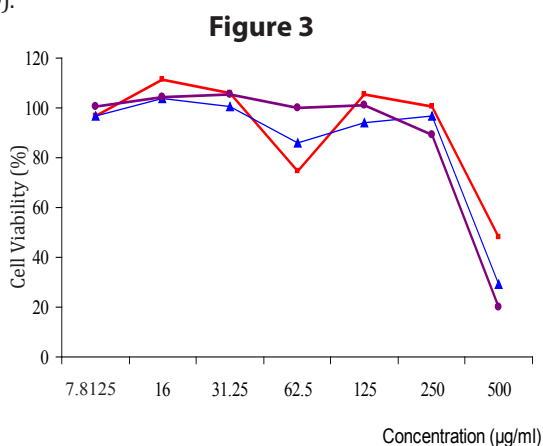


Figure 3. Effect of methanol extract of *D. nemorosa* leaves (µg/ml) on the viability of 293A cell line (%). Antiproliferative activities was measured after incubation for 72h at 37°C with 5% CO₂, and after add WST-1 reagent for 1h (■), 2h (▲) and 4h (●).

1h, 2h and 4h and incubated in CO₂ incubator at 37°C. The absorbance was read at wavelength of 450nm using ELISA reader type Varioskan Flash (Thermo scientific). The percentage cellular viability was calculated with appropriate control taken into account. The concentration which inhibited 50% of cellular growth (IC₅₀) was determined. The inhibitory rate of cell proliferation was calculated by the following formula:

$$\text{Cell Viability (\%)} = \frac{\text{OD Control} - \text{OD treated}}{\text{OD Control}} \times 100$$

RESULT AND DISCUSSION

Cell viability was assayed by determination of the cleavage of tetrazolium salt (WST-1) to formazan by mitochondrial dehydrogenase. This assay is based on the reduction of WST-1 by viable cell producing a soluble formazan salt. The increase in the amount of formazan dye formed is directly correlated to the number of metabolically active cell in culture that was quantified by measuring the absorbance at appropriate wavelength. In this study, toxicity data are expressed as IC₅₀, a concentration of extracts that cause 50% inhibition or cell death, and was obtained by plotting the percentage cell viability versus concentration of methanol extract samples (21). The extract that gave a IC₅₀ value of 1000µg/ml or less was considered chemopreventive activities (22).

The WST-1 assay was conducted, serial dilution of methanol extract were prepared in medium culture cell and results of the cytotoxicity test indicate the methanol extract of *D. nemorosa* was cytotoxic activity against HCT-116, C2C12 and 293A cell lines.

D. nemorosa showed antiproliferative activities against HCT-116 cell line with IC₅₀ values of 199.31 µg/ml (1h), 197.87 µg/ml (2h) and 161.12 µg/ml (4h), for C2C12 cell line with IC₅₀ values of 405.51 µg/ml (1h), 435.12 µg/ml (2h) and 394.38 µg/ml (4h), while for 293A cell line with IC₅₀ values of 580.81 µg/ml (1h), 442.21 µg/ml

(2h) and 366.74 µg/ml (4h), respectively.

The result showed that methanol extract of *D. nemorosa* leaves possess potentials inhibitory effect or antiproliferative activities against HCT-116, C2C12 and 293A cell lines with increasing time incubation. This plant extract containing bioactive compounds that against HCT-116, C2C12 and 293A cell lines. That is usually regarded as interesting for *in vitro* cytotoxic activity when IC₅₀ < 1000 µg/ml and its can be used for chemopreventive agent (22). Based on this study, the extracts showed interesting *in vitro* cytotoxic activity to all cancer cells with various IC₅₀ values.

Since it is known that different cell lines might exhibit different sensitivities while treated with different plant extracts, therefore the use of more than one cell line seems necessary for the comprehensive plant extract anticancer activity screening. Cell type have cytotoxic specificity of plant extracts is likely to be due to the presence of different classes of compounds in the extract.

The activities of these extract against HCT-116, C2C12 and 293A cell line might be due to the presence of highly complex compounds that present in *D. nemorosa*. Different compound might influence different biochemical processes or stages in different manners.

In our preliminary study using paper chromatography also showed that the methanol extract of *D. nemorosa* contains phenolic, alkaloid, tannin and terpenoid compounds but it does not contain saponin.

The result showed that natural compounds present in the extract exhibited a dose-dependent inhibitory effect on cell line used in this study. Many compounds from plant such as phenolic, alkaloid, terpenoid and tannin have been shown to have cancer preventive properties. The biological activities of crude extract can be due to a natural mixture of its components, and a single constituent may be have no an activity greater than that of the total extract as a whole (23).

Phenolics compounds have been indicated to have several biological activities such as antioxidant, antimutagenic, anticarcinogenic, anti-in-

flammatory and antimicrobial activities in human cell line (6,24). Phenolic compounds like epigallocatechin gallate, a major constituent of green tea has been shown to have antitumor activity in animal models of colon (25) and skin cancer (26). Polyphenols from red wine inhibited colon carcinogenesis induced by azoxymethane in rats (27). Another study reported that alkaloid tetrandine irreversibly inhibit the proliferation of human colon carcinoma cell by arresting cell in G₁ followed apoptosis and its increase the p53 and p21 expression in wild type p53 HCT-116 cell line (28). and methanol extract *Cataranthus roseus* (L) contains alkaloid, phenolic, flavonoid, steroid and glycoside had significant anti-cancer against HCT-116 (29), other study about another compounds curcumin (group of polyphenol compounds) isolated from *Curcuma longa* induces apoptosis in HCT-116 cell line (30).

Some terpenoid isolated from chloroform and methanolic extract of *Andrographis paniculata* possess cytotoxic activity against cancer cell lines HepG2, and HCT-116 using MTT Assay (31).

Several study reported many compounds from herbal extract or venom extract different cytotoxicity activity on the different cell line. Quercetin and DMSO modulated and changed Bcl-2 gene expression (Apoptosis regulating proteins) during myogenesis on C2C12 cell line (32) and in cytotoxicity tests, Arsenic trioxide (As₂O₃) has anticancer properties and its significantly reduced cell viability in SY-5Y neuroblastoma and 293A embryonic kidney (HEK) and staining with Hoechst 33342 showed occurrence of apoptosis and DNA damage (33).

Other study reported that bupivacaine and lidocaine caused cytotoxic on C2C12, and prevented cell growth and apoptosis, and it's caused cell death in a dose-dependent manner. IC₅₀ for bupivacaine and lidocaine were 0.49 and 3.37 mmol/L, respectively (34).

Some venom from snake had cytotoxic activities on mouse myoblast cell line and primary human embryonic kidney like 293A, Egyptian cobra venom *N. haje* has cytotoxic effects, induced apop-

tosis and necrosis on 293T (primary human embryonic kidney) and C2C12 cell lines (35), while crude venoms from *B. alternatus* and *B. diporus* induced an early and significant decreased in cell viability C2C12 cell line and induce apoptosis process. *B. diporus* venom was significantly more cytotoxic (CC₅₀: 2 µg/mL) than *B. alternatus* (CC₅₀: 5.8 µg/mL) (36).

It assumed that methanol extract of *D. nemorosa* leaves contains phenolic, alkaloid, terpenoid, and tanin and that compounds responsible for antiproliferative activities against HCT-116, C2C12 and 293A cell culture.

In this study, showed that the ability of methanol extract to inhibit proliferation of HCT-116, C2C12 and 293A cell line was estimated by analysing its effect on the growth of the cells. The increase of the extract concentration, followed by the decrease of formazan dye. The formation of formazan dye directly correlates to the number of metabolically active of cell in the culture (21). It is indicated that methanol extract of *D. nemorosa* leaves proved to possess anticancer properties against HCT-116, C2C12 and 293A lines tested. This result supported the WST-1 experiment as shown in figure 1,2,3.

Various of carcinogenic pathways may be involved in HCT-116, 293A and C2C12 therefore, different approaches will be needed to prevent and treat such cancer.

Further investigations on compounds responsible for cytotoxic effects in this plant and antiproliferative mechanisms on HCT-116, C2C12 and 293A cell line were needed. Furthermore, an understanding of the mechanism of an anticancer agent is also important for future therapeutic application

CONCLUSION

The methanol extract of *Dianella nemorosa* leaves from Papua possess potential antiproliferative activities against HCT-116, C2C12 and 293A cell lines.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant from Sandwich Program 2010, DIKTI Indonesia. We also thank Shin Ichiro Nishimatshu, Ph.D and Yama-

mura, Ph.D from The Department Molecular and Developmental Biology, Kawasaki Medical School, Japan for valuable contribution and adviced on this research during this program.

REFERENCES

- Mathers CD, Boschi PC, Lopez AD, Murray CJL. Cancer Incidence, Mortality and Survival by site for 14 Regions of The World. World Health Organization; 2001.
- Parkin DM. Global Cancer Statistics in The Year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2: 533-543.
- Korkina LG. Phenylpropanoids as Natural Occurring Antioxidants from Plant Defense to Human Health. *Cell Mol Biol* 2007; 53(1): 15-25.
- Ge X, Ye G, Li P, Tang WJ, Gao JL, Zhao WM. Cytotoxic Diterpenoids and Sesquiterpenoids from *Pteris multifida*. *J Nat Prod* 2008; 71: 227-231.
- Akroum S, Satta D, Korrichi Lalaoui K. Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Algerian Plants. *European J Scie Res* 2009; 31(2): 289-295.
- Kaur P, Arora, S. Review: Polyphenol of Caesalpiniaceae. *J Chinese Clinic Med* 2010; 5(5): 282-290.
- Mulukuri NVLS, Mondal NB, Prasad MR, Renuka S, Ramakrishna K. Isolation of Diterpenoid Lactones from the Leaves of *Andrographis paniculata* and Its Anticancer Activity. *Inter J Pharmacog Phytochem Res* 2011; 3(3): 39-42.
- Faried A, Kurnia D, Faried L, Usman N, Miyazaki T, Kato H., Kuwano H. Anticancer Effects of Gallic Acid Isolated from Indonesian Herbal Medicine *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on Human Cancer Cell Lines. *Inter J Oncol* 2007; 30:605.
- Moeljopawiro S, Anggelia MR, Ayuningtyas D, Widaryanti B, Sari Y, Budi, IM. The Effect of Red Fruit Extract (*Pandanus conoideus* Lamk.) on Breast and Colorectal Cancer Cell Lines. *Berkala Ilmiah Biologi* 2007; 6(2): 121-130.
- Astirin OP, Harini M, Handajani, N.S. The Effect of Crude Extract of *Pandanus conoideus* Lamb. var. Yellow Fruit on Apoptotic Expression of the Breast Cancer Cell Line (T47D). *Biodiversitas* 2009; 10(1): 44-48.
- Soeksmanto A, Subroto MA, Wijaya H, Simanjuntak P. Anticancer Activity Test for Extracts of Sarang Semut Plant (*Myrmecodya pendens*) to HeLa and MCM-B2 Cells. *Pakistan J Biol Sci* 2010; 13 (2): 148-151.
- Fitowin JG. Pemanfaatan Pra Kepey (*Dianella* sp Lam.) Sebagai Tanaman Obat Tradisional Oleh Masyarakat Kampung Tablasupa Distrik Depapre, Kabupaten Jayapura. [Skripsi]. Program Studi Biologi-FKIP, Universitas Cenderawasih 2006.
- Maturbongs RA, Arobaya AYS, Haetubu CD, Pugu YR. Etnobotani Suku Tepin di Pulau Salawati Kabupaten Dati II Sorong, Irian Jaya. *Beccariana (Botanical Research Bulletin)* 2000; (2):38-74.
- Karim AK, Sismindari, Asmara W, Istriyati. Cytotoxic Activity of Tegari (*Dianella nemorosa* Lam.) Methanol Extract Against HeLa Cells. *Indonesian of Journal Biotech* 2012; 17(1): 1-9.
- Byrne LT, Colegate SM, Dorling PR, Huxtable CR. Imbricatonol, a Naphthol-Naphthoquinone Dimer Isolated from *Stypanandra imbricata* and *Dianella revolute*. *Austral J Chem* 1987; 40(7):1315- 1320.
- Cheeke PR, editor. *Toxicants of Plants Origin*. CRC Press, Inc. USA; 1989; pp84-94.
- Chung KS, Takeatsu K, Paul PHB, Ji-Xiang G, editors. *International Collation of Traditional and Folk Medicine: Northeast Asia Part III*. World Scientific Publishing Co.Pte.Ltd; 1998; p159.
- Babula P, Adam V, Havel L, Kizek R. Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones: Their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. *Curr Pharm Analys* 2009; 5: 47-68.
- Tripathi L, Tripathi JN. Role of Biotechnology in Medicinal Plants. *Tropc J Pharm Res* 2003; 2(2): 243-253.
- Li TSC. *Taiwanese Native Medicinal Plants Phytopharmacology and Therapeutic Values*. Published by CRC Press Taylor & Francis Group, Broken Sound Parkway NW. USA ; 2006; p37.

21. Francouer AM, Assalian A. Microcat: A Novel Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Based on WST-1. *Biochem* 1996; (3):19-25.
22. Doyle A, Griffiths JB. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. John Willey and Sons, Ltd. New York. 2000.
23. Cragg GM, Newman DJ. Plants as Source of Anti-cancer Agents. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 72-79.
24. Daduang J, Vichitphan S, Daduang S, Hongprabhas P, Patcharee B. High Phenolics and Antioxidants of Some Tropical Vegetables Related to Antibacterial and Anticancer Activities. *African J Pharm Pharmacol* 2011; 5(5): 608-615.
25. Ohishi T, Kishimoto Y, Miura N, Shiota G, Kohri T, Hara Y, Hasegawa J, Isemura M. Synergistic Effects of (-)-Epigallocatechin Gallate With Sulindac Against Colon Carcinogenesis of Rats Treated With Azoxymethane. *Cancer Lett* 2002; 177: 49-56.
26. Lu YP, Lou YR, Xie JG., Peng QY, Liao J, Yang C S, Huang MT, Conney AH. Topical Applications of Caffeine or (-)-Epigallocatechin Gallate (EGCG) Inhibit Carcinogenesis and Selectively Increase Apoptosis in UVB-Induced Skin Tumors In Mice. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 12455-12460.
27. Dolara P, Luceri C, De Filippo C, Femia AP, Giovannelli L, Caderni, G, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. Red Wine Polyphenols Influence Carcinogenesis Intestinal Microflora, Oxidative Damage and Gene Expression Profiles of Colonic Mucosa in F344 Rats. *Mutat Res* 2005; 591: 237-246.
28. Ling Hua, M, Hongliang Z, Larry H, Haruyuki T, Rong Guang S, Yves P. Tetradrine Induce Early G₁ Arrest Human Colon Carcinoma Cell by Down-regulating The Activity and Inducing The Degradation of G₁-S-Specific Cyclin-Dependent Kinases and Inducing p53 and p21^{Cip1}. *Cancer Res* 2004; 64: 9086-9092.
29. Siddiqui MJ, Ismail Z, Aisa AFA, Abdul Majid AMS. Cytotoxic Activity of *Caranthus rosues* (Apocynaceae) Crude Extract and Pure Compounds Against Human Colorectal Carcinoma Cell Line. *Inter J Pharmacol* 2010; 6(1): 43-47.
30. Gavin PC, Frederick CC. Curcumin Induce c-Jun N-Terminal Kinase-Dependent Apoptosis in HCT-116 Human Colon Cancer. *Cell Carcinogenesis* 2004; 25(11): 2183-2189.
31. Sirisha MNVL, Mondal NB, Prasad MR, Renuka S, Ramakrishna K. Isolation of Diterpenoid Lactones from The Leaves of *Andrographis paniculata* and Its Anticancer Activity. *Inter J Pharmacog Phytochem Res* 2011; 3(3): 39-42.
32. Arkadiusz O, Katarzyna G, Wojciech K, Tomasz M. Effect of Quercetin and DMSO on Skeletal Myogenesis from C2C12 Skeletal Muscle Cells with Special Reference to PKB/Akt Activity, Myogenin and Bcl-2 Expression. *Basic Appl Myol* 2001; (1): 31-44.
33. Ana MF, Frank S, Dietrich B. Arsenic Trioxide (As₂O₃) Induced Calcium Signals and Cytotoxicity in Two Human Cell Lines: SY-5Y Neuroblastoma and 293 Embryonic Kidney (HEK). *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 220: 292-301.
34. Joseph MM, Yan G, Fan-xin M, Yong-chang C, Michael H, Yao H. Bupivacaine Causes Cytotoxicity in Mouse C2C12 Myoblast Cells: Involvement of ERK and Akt Signaling Pathways. *Acta Pharmacologica Sinica* 2010; 31: 493-500.
35. Omran MAA, Fabb SA, Dickson G. Biochemical and Morphological Analysis of Cell Death Induced by Egyptian Cobra Venom (*Naja haje*) Venom on Cultured Cells. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2004; 10(3): 219-241.
36. Bustillo S, Lucero H, Leiva LC, Acosta O, Kier JEB, Gorodner J. Cytotoxic and Morphological Analysis of Cell Death Induced Botrops Venom from The Northeast of Argentina. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2009; 15(1): 28-4.

Uji Efek Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Asam Kandis pada Mencit Putih Betina dengan Metode Penetapan Mikronukleus

Fatma Sri Wahyuni, Uci Afrina, dan Almahdy A.

ABSTRACT: The cytotoxic effect of ethanolic extract of the leaf of *Garcinia cowa* Roxb had been studied by bone marrow micronucleus test. Fourty five female mice were clasified into five groups: negative control, positive control, 30 mg/kgBW extract, 100 mg/kgBW extract, and 300 mg/kgBW extract. Each group was divided into three groups based on the duration of treatment. The mice were induced with 50 mg/kgBW cyclophosphamide intraperitoneally. After 30 hours, the extract were administered orally into the treatment groups for the duration of 3, 7, and 15 days. After treatment, the mice were sacrificed to obtain their femur marrow. The parameter investigated was the number of micronucleus. It was shown that the extract at doses of 30, 100, and 300 mg/kgBW decreased the percentage of micronucleus cells significantly compared with positive control ($p<0,05$). The highest decrease of micronuclei cells was showed by the dose of 100 mg/kgBW.

Keywords: cytotoxic effect, *Garcinia cowa* Roxb, bone marrow micronucleus test.

ABSTRAK: Telah dilakukan penelitian tentang efek sitotoksik dari ekstrak etanol daun asam kandis (*Garcinia cowa* Roxb) dengan Metoda Penetapan Mikronukleus. Sebanyak 45 ekor mencit putih betina, dibagi menjadi lima kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif, 30 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, dan 300 mg/kgBB. Tiap-tiap kelompok dibagi lagi menjadi tiga kelompok berdasarkan lama pemberian sediaan uji. Mencit diinduksi dengan siklofosfamida 50 mg/kgBB secara intraperitoneal. Setelah 30 jam, kelompok uji diberikan ekstrak uji secara oral selama 3, 7, dan 15 hari. Setelah perlakuan, mencit dikorbankan dan diambil sumsum tulang femurnya. Parameter yang diamati adalah persentase jumlah sel mikronuklei. Hasil penelitian menunjukkan sediaan uji pada dosis 30, 100, dan 300 mg/kgBB mampu menurunkan persentase jumlah sel mikronuklei secara signifikan dibandingkan kontrol positif ($P < 0,05$). Penurunan persentase sel mikronuklei paling besar diberikan oleh sediaan uji dosis 100 mg/kgBB.

Kata kunci: efek sitotoksik, *Garcinia cowa* Roxb, metode penetapan mikronukleus.

Fakultas Farmasi
Universitas Andalas Padang

Korespondensi:
Fatma Sri Wahyuni
Email : ayufatma@yahoo.com

PENDAHULUAN

Keseimbangan antara perkembangbiakan dan kematian sel pada makhluk hidup multiselular sangatlah penting. Bila keseimbangan ini terganggu maka akan terjadi akumulasi sel atau kehilangan sel. Hilangnya keseimbangan ini juga menyebabkan penyimpangan siklus sel yang akhirnya mengakibatkan terbentuknya kanker (1). Kanker pada dasarnya adalah suatu penyakit sel yang ditandai dengan suatu pergeseran pada mekanisme kontrol yang mengatur proliferasi dan diferensiasi sel yang mengakibatkan pertumbuhan sel menjadi abnormal (2).

Kejadian dan jenis penyakit kanker erat hubungannya dengan berbagai faktor endogen maupun eksogen. Faktor endogen dapat berupa faktor genetik, penyakit, dan hormon sedangkan faktor eksogen dapat berasal dari sinar radiasi, virus, dan zat-zat karsinogen dari makanan, seperti benzopiren, aflatoksin, nitrat, dan nitrosamin (3).

Kanker menempati peringkat kedua sebagai penyebab kematian setelah penyakit kardiovaskuler. Pengobatan penyakit kanker di negeri kita masih tergolong mahal bagi sebagian besar masyarakat (4). Hal inilah yang menyebabkan pengembangan penelitian untuk menemukan obat-obat baru terus berkembang, bahkan dari bahan alampun kini banyak diteliti untuk pengobatan penyakit kanker (5).

Meningkatnya perhatian terhadap penemuan obat baru yang berasal dari alam serta berpotensi dan efektif sebagai antikanker, mengakibatkan sebagian besar dari tanaman obat yang ada, dievaluasi potensi dan efektifitasnya sebagai antikanker. Salah satu tanaman obat tersebut berasal dari genus *Garcinia* (Guttiferae). *Garcinia* (Guttiferae) merupakan genus tanaman yang kaya dengan senyawa xanton teroksidasi dan terprenilasi (6). Asam kandis (*Garcinia cowa* Roxb) adalah salah satu spesies dari genus ini. Tanaman asam kandis dilaporkan memiliki aktivitas biologis dan farmakologis yang bervariasi, seperti sitotoksik, antiinflamasi, antimikroba, antifungi,

dan antioksidan (7). Tanaman asam kandis ini telah digunakan oleh masyarakat, baik berupa buah, daun, akar, dan kulit batangnya dalam berbagai bidang. Di Thailand buah dari asam kandis dapat digunakan untuk memperbaiki sirkulasi darah, sebagai ekspektoran dan sebagai laksatif. Akarnya dapat digunakan sebagai penurun panas dan kulit batangnya sebagai antipiretik dan antimikroba, sedangkan ekstrak kasar dari daun asam kandis ini dalam pengobatan tradisional di Thailand sudah digunakan sebagai antitumor (7).

Penelitian yang telah dilakukan pada tiga jenis sel kanker secara *in vitro*, dilaporkan bahwa ekstrak metanol kulit batang asam kandis menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik yang potensial. Penelitian ini dilakukan terhadap sel kanker payudara (MCF-7) dan diperoleh nilai IC_{50} sebesar $> 100 \mu\text{g/mL}$, pada sel kanker paru (NCI-H460) dengan nilai $IC_{50} = 11 \pm 4$, juga pada sel kanker prostat (DU-145) yang memiliki IC_{50} sebesar $> 100 \mu\text{g/mL}$ (8). Aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun kering asam kandis juga telah diteliti. Dari penelitian dilaporkan, ekstrak metanol daun asam kandis memiliki nilai EC_{50} sebesar $1597,5 \mu\text{g}$ ekstrak/mg, nilai efisiensi anti-radikalnya sebesar $62,7 \times 10^{-5}$, dan total senyawa fenolnya sebesar $2 \mu\text{g}$ GAE/mg ekstrak kering (5).

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu diteliti lebih lanjut aktivitas sitotoksik dari daun asam kandis. Diharapkan nantinya dari penelitian ini diperoleh hasil yang mendukung penggunaan daun tumbuhan ini secara tradisional sebagai antikanker. Hal ini sekaligus untuk membuktikan bahwa daun asam kandis memiliki aktivitas sitotoksik, seperti halnya pada kulit batang asam kandis yang telah terbukti pada penelitian sebelumnya.

METODE PENELITIAN

Alat, Bahan, dan Hewan

Alat yang digunakan: Destilasi vakum, rotari evaporator, erlenmeyer, gelas ukur, beker glass, penjepit kayu, corong, lumpang dan alu, tabung

reaksi, spatel, pinset, pipet tetes, timbangan analitik, timbangan hewan, alat suntik, alat-alat bedah, kaca arloji, vial, kapas, tissue, wadah pewarna, kaca objek, alat sentrifus, sarung tangan, masker dan mikroskop.

Bahan yang digunakan: Daun asam kandis, etanol 70%, pasir bersih, kloroform, asam sulfat, pereaksi Mayer, norit, pereaksi Lieberman-Burchard, asam klorida pekat, besi (III) klorida, serbuk logam magnesium, amonia, asam sulfat 2 N, aquadest, etanol 96%, May-Gruenwald (metilen blue 0,5 g dan eosin Y 0,5 g) ad metanol destilasi 400 ml), buffer fosfat 0,067 M pH 7, Giemsa (metilen blue, metilen azur, eosin Y, dan metanol), aquadest, xylol, siklofosfamida, serum darah anak sapi, buffer fosfat, Na CMC 0,5% natrium sitrat, minyak immersi.

Hewan percobaan yang digunakan: mencit putih jantan sebanyak 45 ekor yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram dan belum pernah mengalami perlakuan terhadap obat.

Prosedur Kerja

Ekstraksi Daun Asam Kandis

Sampel daun asam kandis yang telah dikeringkan, dimasukkan ke dalam beberapa wadah gelas berwarna gelap dan dimaserasi dengan etanol 70% selama 3 hari sambil sekali-sekali diaduk. Maserasi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Hasil maserasi diuapkan pelarutnya dengan alat rotari evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental etanol.

Penyiapan Hewan Percobaan

Sebelum digunakan sebagai hewan percobaan, semua mencit diadaptasi terlebih dahulu selama kurang lebih satu minggu untuk penyesuaian lingkungan, mengontrol kesehatan dan berat badan serta menyerasakan makanan.

Penentuan Dosis

Dosis dari ekstrak etanol daun asam kandis yang digunakan untuk menguji aktivitas antikanker adalah (30, 100, 300) mg/KgBB.

Pembuatan Sediaan Uji

Berat ekstrak yang akan disuspensikan ditimbang terlebih dahulu berdasarkan dosis dan konsentrasi yang dipakai. Konsentrasi ekstrak daun asam kandis dihitung dan dibuat dengan menggunakan rumus :

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{Dosis (mg/kg BB)} \times \text{B (kg)}}{\text{Volume pemberian}}$$

Selanjutnya ekstrak etanol daun asam kandis disuspensikan dalam larutan Na CMC 0,5%, caranya Na CMC sebanyak 0,5 g dikembangkan diatas air panas 20 kalinya dalam lumpang panas, setelah mengembang gerus sampai larutan menjadi bening, kemudian masukkan ekstrak yang telah ditimbang, gerus homogen dan cukupkan volumenya dengan air suling sampai 100 ml.

Pembuatan Serum Darah Anak Sapi

Serum diperoleh dari darah sapi di Fakultas Peternakan Universitas Andalas yang berumur sekitar 16 bulan. Darah segar diambil dengan jarum injeksi melalui vena leher. Darah didiamkan selama 10 menit, lalu disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Pisahkan supernatan dari endapan bekuan darah lalu disentrifus lagi hingga diperoleh 2 lapisan dan ambil lapisan bagian atas.

Pengujian Efek Antikanker

Hewan percobaan dikelompokkan dalam 5 kelompok, terdiri dari 3 kelompok dosis dan 2 kelompok kontrol. Masing-masing kelompok dibagi lagi dalam 3 kelompok berdasarkan lama pemberian sediaan uji. Lama pemberian sediaan uji untuk masing-masing kelompok adalah 3, 7, dan 15 hari. Untuk semua kelompok kecuali kontrol negatif, hewan diinduksi dengan siklofosfamida 50 mg/KgBB pada hari ke-0. Setelah 30 jam, hewan diberikan sediaan uji berdasarkan kelompok masing-masing dan dikorbankan pada hari ke-4, hari ke-8 dan hari ke-16.

Setelah hewan percobaan dibunuh, darahnya ditampung untuk penetapan nilai hematokrit,

kemudian dilakukan pembedahan dan diambil sumsum tulang femurnya. Sumsum tulang ini kemudian dimasukkan ke dalam campuran serum darah anak sapi dengan buffer fosfat (1:1 v/v), lalu dikocok, dibiarkan selama 30 detik dan disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Pelet diambil dan disuspensikan ke dalam 0,5 ml serum darah anak sapi-buffer fosfat (1:1 v/v).

Pembuatan Preparat Apusan Sumsum Tulang Femur

Suspensi sumsum tulang femur dioleskan pada kaca objek, lalu dikering anginkan. Setelah kering, kaca objek yang telah diolesi suspensi sumsum tulang femur direndam dalam metanol selama 10 menit. Kemudian kaca objek direndam dalam 50 ml larutan May-Gruenwald selama 3 menit. Kemudian kaca objek direndam dalam 100 ml larutan May-Gruenwald-buffer fosfat (1:1 v/v) selama 2 menit. Kaca objek lalu dicuci dengan buffer fosfat.

Setelah kering, kaca objek direndam dalam 70 ml larutan Giemsa-buffer fosfat (1:10 v/v) selama 15 – 20 menit. Kemudian kaca objek dicuci dengan buffer fosfat dan dilanjutkan dengan aquadest. Setelah kering, kaca objek direndam dalam etanol 95% selama 45 detik dan terakhir direndam dalam xylol selama 3 menit. Setelah itu dikeringkan dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 100 dengan bantuan minyak immersi.

Penghitungan jumlah sel mikronuklei pada kaca objek yang dihitung pada lima daerah pandang untuk setiap preparat apusan. Sel mikronuklei berwarna biru gelap sedangkan sel normal berwarna biru terang. Setelah itu, tentukan persentase jumlah sel mikronukleinya.

Pengolahan data

Pengolahan data dilakukan dengan uji ANOVA dua arah. Bila hasil pengolahan dengan ANOVA menunjukkan adanya pengaruh maka dilanjutkan dengan uji Duncan. Kedua uji ini dilakukan dengan menggunakan *Software* SPSS 17.0

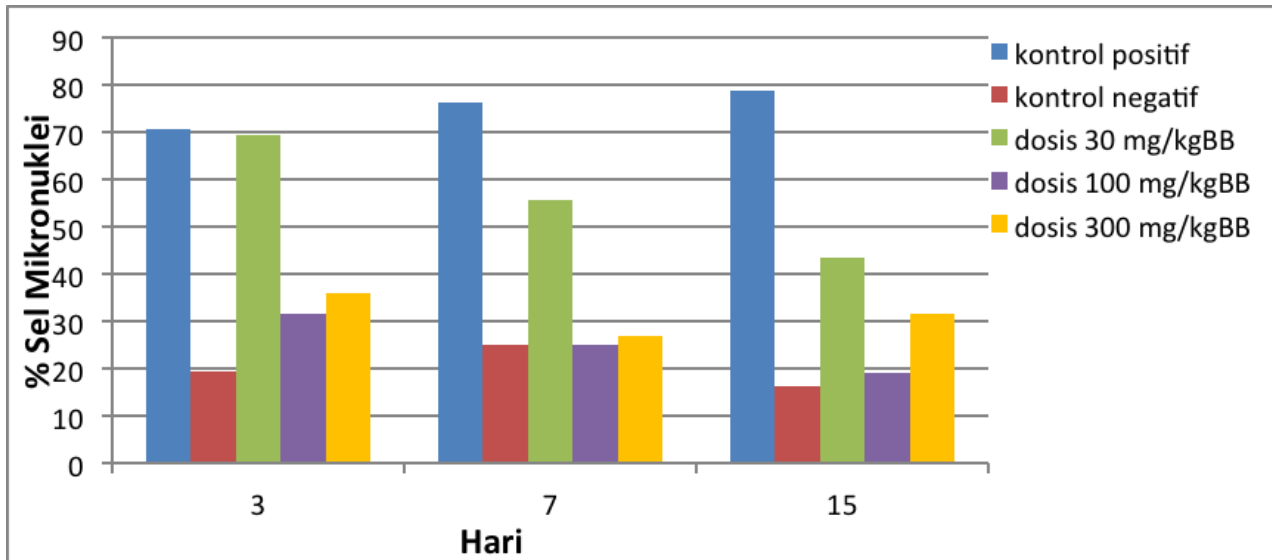
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

1. Dari 2 kg sampel segar daun asam kandis (*Garcinia cowa* Roxb) didapatkan sampel kering sebanyak 560 g dan ekstrak kental etanol seberat 33,38 gram.
2. Persentase jumlah sel mikronuklei pada preparat sumsum tulang femur mencit kelompok kontrol positif pada hari ke-4 adalah 70,57%, hari ke-8 adalah 76,20%, dan hari ke-16 sebesar 78,87%. Kelompok kontrol negatif yang tidak diinduksi dengan siklofosfamid, persentase jumlah sel mikronukleinya pada hari ke-4 adalah 19,56%, hari ke-8 adalah 25%, dan hari ke-16 sebesar 16,44%. Kelompok yang diberi dosis 30 mg/KgBB pada hari ke-4 adalah 69,50%, hari ke-8 adalah 55,68% dan hari ke-16 adalah 43,48%. Kelompok dosis 100 mg/KgBB pada hari ke-4 adalah 31,51%, hari ke-8 adalah 25,15%, dan hari ke-16 adalah 19,11%. Kelompok dosis 300 mg/KgBB pada hari ke-4 adalah 36,02%, hari ke-8 adalah 26,95%, dan hari ke-16 adalah 31,55%, terlihat pada gambar 1.

Pembahasan

Uji aktivitas antikanker daun asam kandis dilakukan dengan metoda Micronucleus Assay. Metoda ini digunakan untuk mendeteksi adanya kerusakan DNA yang terjadi pada kromosom dan pada perlengkapan mitosis dari sel mamalia (9). Prinsip metoda ini berdasarkan pada peningkatan jumlah sel mikronuklei polikromatik eritrosit yang terdapat dalam sumsum tulang dari hewan percobaan dibandingkan dengan hewan kontrol. Peningkatan jumlah sel mikronuklei polikromatik eritrosit dalam sumsum tulang merupakan indikator adanya kerusakan kromosom atau perlengkapan mitotik yang diinduksi oleh senyawa kimia (10). Sel mikronuklei terbentuk karena adanya mutasi dari kromosom utuh yang patah dan kemudian tampak sebagai nukleus berukuran kecil dalam suatu sel (11).



Gambar 1. Hubungan antara persentase sel mikronuklei dengan waktu pengamatan pada mencit putih betina

Sebagai penginduksi kanker digunakan siklofosamid dosis tunggal 50 mg/KgBB secara intraperitoneal. Siklofosamid merupakan suatu senyawa pengalkilasi yang biasanya digunakan sebagai antikanker. Kerja siklofosamid tidak spesifik sehingga pada saat digunakan sebagai antikanker juga menimbulkan kerusakan pada sel normal, terutama jaringan yang mempunyai laju pembelahan sel yang tinggi, seperti sumsum tulang, saluran cerna, dan kelenjer gonad (2).

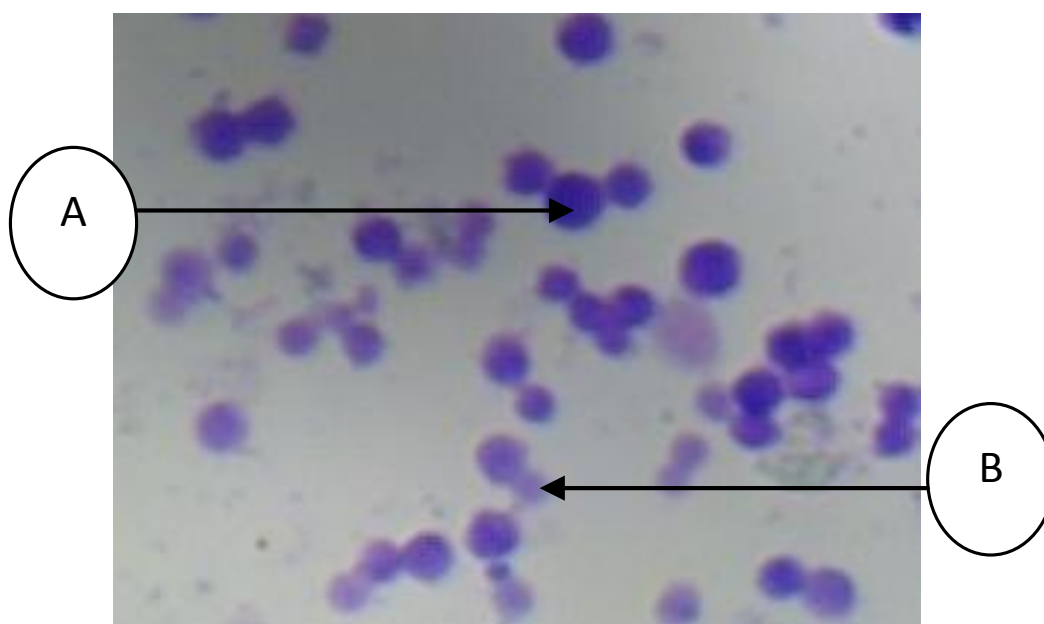
Adanya efek karsinogen siklofosamid berhubungan dengan ketidakmampuan enzim pada sel normal untuk menetralkan metabolit siklofosamid yang bersifat reaktif dalam jumlah besar, yaitu 4-hidroksisiklofosamida, mustard fosforamid, dan akrolein (12). Akibatnya metabolit reaktif yang bersifat elektrofil akan menyerang komponen sel yang bersifat nukleofilik dan sering diserang adalah basa N7 guanin pada DNA (2). Bila terjadi kerusakan pada DNA, maka kode-kode pada DNA mengalami kekacauan sehingga terjadi perubahan informasi genetik yang menghasilkan protein mutan dan juga mengakibatkan hilangnya mekanisme kontrol yang mengatur pembelahan dan pertumbuhan sel (13). Metabolisme siklofosamid juga dilaporkan menyebabkan peningkatan radikal anion superoksida dan hidroksil

yang mungkin ikut berperan dalam menginduksi pembentukan mikronukleus (14).

Sel kanker mempunyai DNA yang abnormal, dimana jumlah keseluruhan DNA per sel biasanya lebih banyak dari sel normal diploid (2N). Keadaan ini dikenal sebagai hiperkromatik inti. Jumlah DNA dapat meningkat sesuai dengan perkalian yang tetap dari keadaan diploid (poliploid), seperti tetraploid (4N) dan oktaploid (8N). Hal ini disebabkan karena sel kanker melakukan aktivitas proliferasi yang berlebihan dibandingkan dengan sel normal (15).

Sel mikronuklei (kanker) yang mengalami kerusakan kromosom akan terus berproliferasi dan membentuk inti-inti baru dengan ukuran yang lebih kecil dibanding sel normal (11). Inti-inti ini mengandung asam nukleat yang sama dengan inti awal, sehingga kandungan asam nukleatnya lebih tinggi dibandingkan sel normal (13). Inti-inti baru dari sel kanker ini akan menyebar dalam sitoplasma sehingga menutupi permukaan sel. Setelah pewarnaan, sel yang mengalami perubahan inti ini, akan berwarna lebih gelap dibandingkan dengan sel normal (16).

Penghitungan hasil dilakukan dengan menghitung jumlah sel mikronuklei dan sel normal pada 5 tempat yang berbeda, lalu ditentukan



Gambar 2. Foto pemeriksaan preparat apusan sumsum tulang femur mencit kelompok dosis II (100 mg/kg BB) setelah 15 hari penginduksian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x40. (A) Sel Mikronuklei Normal, (B) Sel.

persentase jumlah sel mikronukleinya dengan membandingkan jumlah sel mikronuklei terhadap jumlah sel total (sel mikronuklei dan sel normal) pada daerah pandang. Pengulangan perhitungan dilakukan untuk memperkecil faktor kesalahan pada penghitungan. Dari data jumlah sel mikronuklei yang didapatkan, dilakukan pengolahan data secara statistik menggunakan analisa sidik ragam (ANOVA) dua arah. Hal ini untuk mengetahui apakah peningkatan dosis, waktu, serta interaksi antara dosis dan waktu pada masing-masing kelompok hewan percobaan akan memberikan perbedaan efek yang berarti atau tidak terhadap jumlah sel mikronukleinya.

Hasil pengamatan kelompok hewan kontrol positif yang hanya diinduksi dengan siklofosfamida dosis tunggal 50 mg/kgBB, rata-rata jumlah sel mikronukleinya mencapai 70,57% setelah 3 hari, 76,20% setelah 7 hari, dan 78,87% setelah 15 hari penginduksian. Sedangkan pada kontrol negatif yang tanpa diberi siklofosfamida, rata-rata jumlah sel mikronukleinya hanya 19,56% setelah 3 hari, 25% setelah 7 hari, dan 16,44% setelah 15 hari. Hal ini menunjukkan bahwa

pemberian siklofosfamida dosis tunggal 50 mg/KgBB secara intraperitoneal dapat meningkatkan jumlah sel mikronuklei pada sumsum tulang femur mencit. Rata-rata jumlah sel mikronuklei hewan uji setelah pemberian ekstrak etanol daun asam kandis selama 3, 7 dan 15 hari pengamatan pada dosis 30 mg/KgBB adalah 69,50%, 55,68%, dan 43,48% ; pada dosis 100 mg/KgBB adalah 31,51%, 25,15%, dan 19,11% ; serta pada dosis 300 mg/KgBB adalah 36,02%, 26,95%, dan 31,55%.

Berdasarkan hasil tersebut, terlihat bahwa terjadi penurunan jumlah sel mikronuklei pada kelompok hewan percobaan yang diberi ekstrak daun asam kandis dibandingkan dengan kontrol positif, dimana penurunan ini sebanding dengan kenaikan dosis dan lama pemberian ekstrak.

Senyawa fenolik dan flavonoid (polifenol) yang terkandung pada daun asam kandis, diduga berperan sebagai sitotoksik pada hewan percobaan. Aktivitas sitotoksik senyawa ini ditunjukkan dengan adanya penurunan jumlah sel mikronuklei dan peningkatan jumlah sel normal. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan besar

aktivitas sitotoksik dari ekstrak daun asam kandis ini berhubungan dengan aktivitasnya sebagai antioksidan.

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat melawan kerja radikal bebas yang berlebihan didalam tubuh. Berdasarkan sifatnya yang mudah dioksidasi (menyerahkan elektron), antioksidan dapat menstabilkan dan menetralkan sebagian besar radikal bebas yang berlebihan (17). Senyawa antioksidan setelah bereaksi dengan radikal bebas akan menghasilkan radikal baru yang stabil atau senyawa bukan radikal (18).

Senyawa radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab kerusakan DNA di samping penyebab lain seperti virus, radiasi, dan zat kimia karsinogen (3). Radikal bebas dalam tubuh bersifat sangat reaktif. Untuk menjadi stabil, radikal memerlukan elektron yang berasal dari pasangan elektron molekul disekitarnya, sehingga terjadi perpindahan elektron dari molekul donor ke molekul radikal untuk menjadikan molekul tersebut stabil. Akibat reaksi tersebut, molekul donor menjadi radikal baru yang tidak stabil dan memerlukan elektron dari molekul di sekitarnya untuk menjadi stabil. Demikian seterusnya terjadi reaksi berantai perpindahan elektron (19).

Radikal bebas dalam jumlah tertentu diperlukan dalam tubuh untuk dapat memerangi peradangan, membunuh bakteri dan mengendalikan tonus otot polos pembuluh darah (19). Namun, jika keberadaannya melebihi daya proteksi endogen, radikal bebas tersebut dapat merusak membran sel dan menginisiasi terjadinya kanker dengan mengoksidasi DNA (20).

Senyawa fenolik dan flavonoid mempunyai cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksil (OH). Di alam, senyawa fenolik sering dijumpai terikat pada protein, alkaloid, dan terdapat di antara terpenoid. Fenolik dan flavonoid berperan sebagai antioksidan karena dapat menangkap radikal bebas dengan melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya. Pemberian atom hidrogen ini akan menyebabkan radikal bebas menjadi stabil dan berhenti melakukan gerakan ekstrim, sehingga tak merusak lipida, protein, dan DNA (materi

genetik) yang menjadi target kerusakan seluler. Dengan mekanisme seperti itu, radikal bebas dapat dihancurkan atau distabilkan yang pada akhirnya dapat menekan terjadinya kanker (21).

Mekanisme lain dari golongan flavonoid dalam memerangi pertumbuhan sel kanker adalah sebagai antiproliferasi sel dan menginduksi terjadinya apoptosis. Mekanisme ini didasarkan pada, kemampuan dari senyawa flavonoid dalam menghambat aktivitas dari protein kinase yang terlibat dalam regulasi proliferasi sel (22). Protein kinase merupakan salah satu enzim yang berperan dalam mengatur sebagian besar jalur sinyal dan mengontrol hampir semua kegiatan pertumbuhan maupun kematian sel (23). Semua proses ini akan berakhir pada kematian sel kanker karena kegagalan regenerasi dan penurunan jumlah sel mikronuklei seiring berjalannya waktu.

Penurunan terbesar persentase jumlah sel mikronuklei dibandingkan terhadap kontrol positif, yang juga menunjukkan aktivitas terbesar, diperoleh pada dosis 100 mg/kgBB selama 15 hari pemberian ekstrak, yaitu sebesar 75,77 %. Namun, terlihat bahwa terjadi penurunan aktivitas sitotoksik pada dosis 300 mg/KgBB dibandingkan dengan dosis 100 mg/KgBB. Penurunan aktivitas sitotoksik pada dosis 300 mg/kgBB ini, dapat disebabkan oleh konsentrasi senyawa fenolik dan flavonoid (polifenol) ekstrak daun asam kandis yang bertindak sebagai antioksidan sudah terlalu tinggi. Konsentrasi flavonoid yang terlalu tinggi berpotensi menimbulkan toksisitas bagi tubuh. Pada dosis yang lebih tinggi, flavonoid dapat bertindak sebagai mutagen, prooksidan yang menghasilkan radikal bebas. Antioksidan hanya akan berfungsi ketika ada senyawa prooksidan (pemicu proses oksidasi) dalam tubuh. Ketika dosis antioksidan dan prooksidan tidak seimbang atau kadar antioksidan tinggi sedangkan prooksidan rendah, maka tubuh akan membentuk senyawa prooksidan untuk menyeimbangkan kadarnya dengan antioksidan, dan hal ini akan membuat sel-sel radikal bebas tidak bisa diperbaiki lagi (24).

Dari hasil penelitian diketahui bahwa ekstrak etanol daun asam kandis potensial untuk digunakan sebagai sitotoksik, dimana aktivitasnya dapat dilihat dari penurunan jumlah sel mikronuklei mencit putih betina yang sudah diinduksi kanker setelah pemberian ekstrak dibandingkan terhadap kontrol positif. Selain itu, aktivitas ini juga didukung oleh kemampuannya dalam meningkatkan nilai hematokrit mencit putih betina menjadi kadar normal setelah diinduksi oleh siklofosamid dosis tinggi yang terbukti menurunkan nilai hematokrit sampai di bawah kadar normal.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun asam kandis (*Garcinia cowa* Roxb) pada dosis (30, 100, dan 300) mg/KgBB mempunyai aktivitas sitotoksik. Hal ini dapat dilihat dari penurunan jumlah sel mikronuklei pada sumsum tulang femur mencit percobaan secara bermakna dibandingkan kontrol positif serta peningkatan nilai hematokrit mencit percobaan dibandingkan kontrol positif.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jusuf, Ahmad Aulia. Aspek Genetik Kanker. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Universitas Indonesia; 2008.
2. Salmon SE, Sartorelli AC. Kemoterapi Kanker in Katzung, B. G. Farmakologi Dasar dan Klinik (Edisi VI). Penerjemah: Staf Dosen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 1997.
3. Dipiro, Joseph, Talbert, Robert L & Yee, Gary C. Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach (7th ed). United States of America: The McGraw-Hill Companies; 2008.
4. Reksodiputro A, Harryanto. Onkologi Medis Masa Lampau, Kini, Dan Masa Mendatang: Peranannya Dalam Menunjang Strategi Penanggulangan Kanker Secara Terpadu. Deskripsi Dokumen. Jakarta: Universitas Indonesia; 2006.
5. Nanasombat S, Teckchuen N. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *Journal of Medicinal Plants Research* 2009; 3(5): 443-449.
6. Wahyuni FS, Byrne LT, Dachriyanus, Dianita R, Jubahar J, Lajis NH, Sargent MV. A New Ring-Reduced Tetraprenyltoluquinone and a prenylated xanthone from *Garcinia cowa*. *Aust. J. Chem* 2004; 57: 223-226.
7. Mahabusarakam W, Chairerk P, Taylor WC. Xanthones from *Garcinia cowa* Roxb. latex. *Phytochemistry* 2004; 66 (2005): 1148-1153.
8. Jabit Md. Lip, Wahyuni FS, Khalid R, Israf DA, Shaari K, Lajis NH & Stanslas J. Cytotoxic and nitric oxide inhibitory activities of methanol extracts of *Garcinia* species. *Pharmaceutical Biology* 2009; 47(11): 1019-1026.
9. Fenech, Michael. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455 81-95 CSIRO. Health Sciences and Nutrition. Australia: Adelaide BC 5000; 2000.
10. Busk L, Sjostrom B & Ahlborg UG Effect of Vitamin A on Cyclophosphamida Mutagenicity In vitro (Ames Test) and in vivo (Mouse Micronucleus Test. *Fd. Chem, Toxic* 1994: 22.
11. Purwadiwarsa DJ, Subarnas A, Hadiansyah C, Supriyatna. Aktivitas Antimutagenik dan Antioksidan Daun Puspa (*Schima wallichii* Kort). *Cermin Dunia Kedokteran* No. 127. Bandung: Universitas Padjajaran; 2000.
12. Mutschler E. Dinamika Obat : Buku Ajar Farmakologi dan Toksikologi (Edisi 5). Penerjemah: Mathilda B. W. dan Anna S. Bandung: Penerbit ITB; 1995.
13. Pai AC. Dasar-dasar Genetika, Edisi Kedua. diterjemahkan oleh Muchidin Apandi. Jakarta: Penerbit Erlangga; 1987.
14. Ramu K, Perry CS, Ahmed T, Pakenham G, Kehrer JP. Studies On The Basis For The Toxicity Of

- Acrolein Mercapturates. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1996; 140: 487-98.
15. Abrams GD. Gangguan Pertumbuhan, Proliferasi dan Diferensiasi Sel in Price, S. A. dan L. M. Wilson. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-proses Penyakit*, Edisi 4, diterjemahkan oleh Peter Anugerah. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC: 1994.
16. FDA. *Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*. Redbook; 2000.
17. Hariyatmi. Kemampuan Vitamin E Sebagai Antioksidan Terhadap Radikal Bebas Pada Lanjut Usia. *Jurusan Pendidikan Biologi Fkip Ums MIPA* 2004; 14: 152 - 60.
18. Vaya, Jacob & Aviram, Michael. Nutritional antioxidant : mechanism of action, analyses of activities and medical applications. *Curr. Med. Chem-Imm,Endoc.&Metab,Agents*2001;1:99-117.
19. Langseth, Lilian. *Oxidant, Antioxidant and Disease Prevention*. Belgium: International Life Science Institute press; 1995.
20. Reynertson KA. *Phytochemical Analysis of Bio-active Constituents from Edible Myrtaceae Fruit*. (Dissertation). New York: The City University of New York; 2007.
21. Shahidi F, Naczek M. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications*. Ed. Technomic Publishing Co. Inc; 1995.
22. Kanadaswami C, Lee, Lung-TA, Ping-Ping, Jiu, Jiu H., Ferng, Chun, Ying, Tung Huang & Ming, Ting L. The Antitumor Activities of Flavonoids. *in vivo*. 2005; 19: 895-910.
23. Stansfield WD, Colome, Jaime S & Cano, Raul J. *Molecular and Cell Biology*. United States of America: The McGraw-Hill Companies; 2006.
24. Skibola CF, Smith MT. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(3-4): 375-83.
25. Nafrialdi, Gunawan SG. *Farmakologi dan Terapi* (Edisi V). Jakarta: Percetakan Gaya Baru; 2007.
26. Watson JD, Tooze J, Kurtz DT. *DNA Rekombinan*. Penerjemah: Wisnu Gunarso. Jakarta: Penerbit Erlangga; 1987.

Bioaktivitas Ekstrak *n*-Heksana dan Alkaloida Kasar Kulit Batang *Actinodaphne macrophylla* (Blume) Nees var *angustifolia* Koord & Valeton

Tiah Rachmatiah dan Subaryanti

ABSTRACT: Bioactivities of *n*-hexane extract and crude alkaloid extract from stem bark of *Actinodaphne macrophylla* (Blume) Nees var *angustifolia* Coordinator. & Valeton (Lauraceae) have been investigated. The plants of Lauraceae family are known to contain active compounds such as alkaloids, lactones, fatty acids, terpenes and essential oils. Phytochemical screening of the bark exhibited that it contains triterpenoids, alkaloids and tannins. *N*-hexane extract was prepared by maceration and the crude alkaloid extract was prepared by maceration in dichloromethane after the powdered bark was previously moistened with 25% NH_4OH . The bioactivity assays involved the test of toxicity against brine shrimp larvae (*Artemia salina* Leach), cytotoxicity against Murine P-388 cells and antimalarial against *Plasmodium falciparum*. The results indicated that *n*-hexane extract was active against shrimps larvae with LC_{50} value of 85.11 ppm, and against *P. falciparum* with IC_{50} values of 1.824 ppm, but inactive against Murine P-388 cells with IC_{50} values of 43.0 ppm, while the crude alkaloid extract was active against shrimp larvae with LC_{50} value of 36.31 ppm, against Murine P-388 cells with IC_{50} value of 5.2 m ppm, and against *P. falciparum* with IC_{50} value of 0.1 ppm.

Keywords: Lauraceae, *Actinodaphne*, bioactivity, alkaloids, extract.

ABSTRAK: Telah dilakukan pengujian bioaktivitas ekstrak *n*-heksana dan ekstrak alkaloida kasar dari kulit batang *Actinodaphne macrophylla* (Blume) Nees var *angustifolia* Koord.& Valeton, familia Lauraceae. Tumbuhan dari familia ini dikenal mengandung berbagai senyawa aktif seperti alkaloida, lakton, asam lemak, terpen dan minyak atsiri. Penapisan fitokimia dari serbuk kulit batang tumbuhan ini memperlihatkan adanya kandungan triterpenoid, alkaloida dan tannin. Ekstrak *n*-heksana dibuat dengan cara maserasi, sedangkan ekstrak alkaloida kasar dibuat dengan cara maserasi dalam diklorometana setelah serbuk kulit batang dilembabkan terlebih dahulu dengan NH_4OH 25%. Uji bioaktivitas meliputi uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach, uji sitotoksitas terhadap sel Murine P-388 dan uji antimalaria terhadap *Plasmodium falciparum*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksana bersifat aktif terhadap larva udang dengan nilai LC_{50} 85,11 ppm, dan terhadap *P. falciparum* dengan nilai IC_{50} 1,824 ppm, namun tidak aktif terhadap sel Murine P-388 dengan nilai IC_{50} 43,0 ppm, sementara itu ekstrak alkaloida kasar bersifat aktif terhadap larva udang dengan nilai LC_{50} 36,31 ppm, terhadap sel Murine P-388 m dengan nilai IC_{50} 5,2 ppm, dan terhadap *P. falciparum* dengan nilai IC_{50} 0,1 ppm.

Kata kunci: Lauraceae, *Actinodaphne*, bioaktivitas, alkaloida, ekstrak.

Program Studi Farmasi
FMIPA-ISTN, Jakarta

Korespondensi:

Tiah Rachmatiah
Email : tiahrachmatiah@yahoo.com

PENDAHULUAN

Actinodaphne, merupakan salah satu genus dari Lauraceae, berupa pohon atau semak, yang terdiri dari 60 atau 70 spesies dan tumbuh di daerah Asia tropis dan subtropis yaitu dari Srilangka, India, Indo-Cina, Cina, Jepang, Thailand, seluruh wilayah Malaysia sampai ke timur kepulauan Solomon. Ada enam spesies yang dijumpai di Jawa yaitu *A. procera*, *A. sphaerocarpa*, *A. glomerata*, *A. macrophylla*, *A. glabra* dan *A. angustifolia* (1). Nama daerah dari genus ini adalah huru (Sunda), wuru (Jawa), medang kuning, medang kunyit (Malaysia) dan kyese (Myanmar). Kebanyakan tanaman ini diambil kayunya untuk konstruksi, furnitur, produksi plywood dan perahu, namun ada juga yang digunakan sebagai obat tradisional seperti daun dari *A. molucana* yang dimemarkan telah digunakan sebagai obat luar untuk rasa sakit dan patah tulang (2,3). Di Cina akar dari tanaman *A. lancifolia* (Sieb. Et Zucc) Meissn. var. *sinensis* digunakan untuk mengobati sakit perut, artritis, kelelahan, dan bengkak (4). Telah dilaporkan pula bahwa buah dari *A. sesquipedalis* sangat beracun (1) dan *A. procera* dilaporkan mengandung senyawa laurotetanin yaitu racun yang dapat menyebabkan kejang (5). Penelitian terakhir memperlihatkan bahwa ekstrak alkaloida kulit batang *A. sphaerocarpa* memiliki aktivitas antiplasmodium dengan IC_{50} $2,5 \times 10^{-6}$ ppm (6) dan ekstrak alkaloida dari *A. pruinosa* serta kandungan alkaloidanya yaitu (+)-N-(2-hidroksipropil) lindcarpin mempunyai daya sitotoksik terhadap sel leukemia Murine-P388 dengan IC_{50} 3,9 ppm (7). Beberapa spesies lain yang sudah dilaporkan kandungan kimianya antara lain *A. nitida*, *A. acutivena*, *A. obovata*, *A. sesquipedalis*, *A. lancifolia*, *A. longifolia*, *A. angustifolia*, *A. cupularis*, *A. speciosa*, dan *A. cupularis*. Jenis senyawa yang pernah diisolasi dari spesies tersebut kebanyakan alkaloida disamping senyawa lain seperti lakton, minyak atsiri, asam lemak dan terpen. Penelitian yang dilakukan pada tumbuhan spesies *Actinodaphne* di atas adalah tumbuhan yang bukan diperoleh dari Indonesia, sementara itu di Indonesia ada banyak spesies lain yang

dapat memberikan peluang untuk mendapatkan senyawa-senyawa baru yang berpotensi sebagai obat. Hasil survey di Kebun Raya Bogor menunjukkan ada beberapa spesies *Actinodaphne* diantaranya adalah *Actinodaphne macrophylla*. Pada umumnya spesies yang berbeda serta lingkungan dan tempat tumbuh suatu tanaman akan memberikan variasi pada kandungan kimianya, oleh karena itu tidak menutup kemungkinan adanya senyawa aktif lain dapat diperoleh dari spesies tumbuhan tersebut. *Actinodaphne macrophylla* adalah tumbuhan berupa pohon dengan tinggi sampai 37 m yang terdistribusi dari Semenanjung Malaya, Sumatera, Jawa sampai Kalimantan. Sinonim dari *A. macrophylla* adalah *Actinodaphne maingayi* dan *Litsea macrophylla*. Pohon, daun dan kulit batang *A. macrophylla* yang telah dikeringkan dapat dilihat pada gambar 1.

Tahap awal untuk mempelajari bioaktivitas suatu senyawa adalah uji toksisitas secara *in vitro*. Pengujian secara *in vitro* ini relatif lebih cepat, murah, dan hanya membutuhkan sedikit bahan uji. Suatu prosedur umum untuk skrining toksisitas suatu ekstrak atau senyawa adalah dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) yang menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach (8,9). Selanjutnya dapat dilakukan pengujian sitotoksitas pada sel kanker untuk mengetahui prospeknya sebagai antikanker antara lain dengan menggunakan sel murine leukemia P-388 dan pengujian bioaktivitas bahan uji sebagai antimalaria yang dilakukan pada parasit malaria *Plasmodium falciparum* dengan pembanding klorokuin dan artemisinin (9).

METODE PENELITIAN

Tempat Penelitian

Pembuatan ekstrak dan penapisan fitokimia dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi (Fitokimia), Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Sains dan Teknologi Nasional, Jakarta. Pengujian toksisitas ekstrak dengan BSLT dilaksanakan di Laboratorium Bahan Alam, P2K LIPI-Serpong, pengujian ak-

tivitas antimalaria ekstrak alkaloida kasar dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Bidang Biomedika, PTKMR, BATAN dan untuk ekstrak *n*-heksana dilakukan di Departemen Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya. Pengujian sitotoksitas ekstrak dengan sel Murine P-388 dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Prodi Kimia ITB, Bandung.

Material tanaman

Kulit batang dari tumbuhan *Actinodaphne macrophylla* yang diperoleh dari Kebun Raya Bogor, Jawa Barat pada bulan Mei 2011. Spesimen tumbuhan dideterminasi di Kebun Raya Bogor dan disimpan di Laboratorium Fitokimia FMIPA-ISTN. Kulit batang dikeringkan dalam ruang ber AC dan diserbuk dengan menggunakan *blender*.

Penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan pada serbuk kulit batang *A. macrophylla*. Senyawa yang diidentifikasi meliputi alkaloida, flavonoida, tanin dan triterpenoid/steroid.

Pembuatan Ekstrak

1. Ekstrak *n*- heksana

Serbuk sebanyak lebih kurang 1 kg dimaserasi dalam *n*-heksana selama 24 jam, lalu disaring, maserasi diulang kembali sebanyak 2 kali. Filtrat

dievaporasi menggunakan penguap putar vakum dengan suhu 40°C.

2. Ekstrak alkaloida kasar

Residu (ampas) sisa ekstraksi dengan *n*-heksana dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, lalu dilembabkan dengan NH_4OH 25% dan didiamkan selama lebih kurang 2 jam, kemudian dimaserasi dengan diklorometana selama 24 jam setelah itu disaring. Maserasi diulang sebanyak dua kali. Filtrat dikumpulkan dan dievaporasi sampai setengahnya, lalu dimasukkan ke dalam corong pisah dan dikocok dengan larutan NH_4Cl jenuh. Setelah itu didiamkan sampai terjadi dua lapisan cairan air dan diklorometana. Lapisan diklorometana diambil dan dikocok kembali dengan larutan NH_4Cl jenuh, lalu diklorometana dipisahkan kembali dan dikocok dengan air sebanyak tiga kali. Lapisan diklorometana diambil dan ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat, kemudian disaring. Filtrat diuapkan dengan penguap putar vakum sampai diklorometana habis terdestilasi.

Uji Toksisitas terhadap larva *Artemia salina*.

Ekstrak ditimbang sebanyak 4 mg lalu dilarutkan dalam 10 μL DMSO dan air laut sampai 2000 μL , lalu dibuat larutan seri dengan konsentrasi ekstrak 1000, 500, 100, dan 10 ppm yang masing-masing dibuat triplo. Setiap larutan seri dimasukkan 10 ekor larva udang yang berusia 48 jam, dan didiamkan selama 24 jam di bawah sinar lampu (18 Watt) kemudian dihitung jumlah larva yang



Gambar 1. Tumbuhan, daun dan kulit batang *A. macrophylla*

mati dan yang hidup secara visual menggunakan pipet tetes dengan bantuan penerangan lampu. Perhitungan mortalitas dilakukan dengan cara analisis probit dan nilai LC_{50} ditentukan dengan rumus regresi linear.

Uji Sitotoksitas terhadap sel murine P-388:

Pengujian sitotoksitas dilakukan dengan metode MTT-microculture tetrazolium assay.

Uji Antimalaria:

Pengujian daya antimalaria dimulai dengan propagasi *P. falciparum* pada kultur in vitro dengan parasitemia 1-2% pada cawan petri yang berisi medium RPHS dengan hematokrit 4%. Medium pertumbuhan diganti setiap hari. Sebelum melakukan uji daya hambat pertumbuhan *P. falciparum*, parasit dipersiapkan dengan cara menyediakan serum darah, eritrosit tanpa parasit dan eritrosit terinfeksi *P. falciparum*. Selanjutnya dilakukan variasi pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} pada ekstrak konsentrasi 1 mg/mL. Ekstrak yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam lempeng sumur uji yang telah berisi 2 ml medium lengkap dengan hematokrit 4 % dan ditambahkan 160 μ L suspensi sel parasit parasitemia awal sekitar 2%, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Prosedur yang sama juga dilakukan pada klorokuin sebagai kontrol. Pengamatan jumlah parasit dilakukan pada awal inokulasi dan hari ke-2 meliputi angka parasitemia. Pertumbuhan parasit diamati dengan membuat sediaan apus darah tipis. Apusan dibiarkan mengering kemudian difiksasi dengan metanol. Apusan diwarnai dengan 5% larutan Giemsa dan dibiarkan 20 menit. Preparat diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. Jumlah parasit yang hidup dihitung dengan cara menghitung jumlah darah yang terinfeksi parasit pada zat uji dan kontrol terhadap 10.000 sel darah merah. Efektifitas dari ekstrak ditunjukkan dari kemampuan ekstrak untuk menghambat pertumbuhan parasit sebesar 50%. Parasit yang digunakan adalah *P. falciparum* 3D7 sensitif terhadap klorokuin dengan IC_{50} 10^{-9} x 1

mg/mL diperoleh dari Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta.

HASIL DAN DISKUSI

Hasil determinasi menyatakan bahwa bahan uji adalah spesies *Actinodaphne macrophylla* (Blume) Nees var *angustifolia* Koord.& Valeton. Penapisan fitokimia memperlihatkan bahwa kulit batang *A. macrophylla* mengandung alkaloida, triterpenoid, dan tanin (tabel 1).

Tabel 1. Hasil penapisan fitokimia serbuk kulit batang *Actinodaphne macrophylla*

Pengujian	Hasil
Alkaloida	+
Flavonoida	-
Tanin	+
Triterpenoid	+

Hasil uji toksisitas ekstrak *n*-heksana dan ekstrak alkaloida kasar terhadap larva udang *Artemia salina* memberikan nilai LC_{50} di bawah 100 ppm (tabel 2), yang menunjukkan kedua ekstrak tersebut sangat aktif dengan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm (8,9). Hasil penelitian sebelumnya pada pengujian toksisitas ekstrak alkaloida dari kulit batang jenis *Actinodaphne* lainnya yaitu *Actinodaphne sphaerocarpa* dan *Actinodaphne pruinosa* juga memperlihatkan LD_{50} 126,65 dan 106,46 ppm (6). Umumnya hasil pengujian toksisitas dengan larva udang ini mempunyai korelasi dengan bioaktivitas lain seperti aktivitas sebagai antikanker. Dengan demikian dapat dikatakan kulit batang dari jenis *Actinodaphne* bersifat toksik dan berpotensi mengandung senyawa aktif sebagai antikanker.

Secara keseluruhan bioaktivitas ekstrak alkaloida lebih tinggi daripada ekstrak *n*-heksana karena dari hasil ketiga pengujian ekstrak alkaloida total memberikan nilai LC_{50} dan IC_{50} yang lebih kecil (tabel 2). Pada uji sitotoksitas ekstrak alkaloida total terhadap sel Murine P-388

Tabel 2. Hasil pengujian bioaktivitas ekstrak dari kulit batang *Actinodaphne macrophylla*

Ekstrak	Hasil pengujian		
	BSLT LC ₅₀ (ppm)	P-388 IC ₅₀ (ppm)	Antimalaria IC ₅₀ (ppm)
<i>n</i>-Heksana	85,11	43,0	1,824
Alkaloida	36,31	5,2	0,1

memberikan nilai IC₅₀ dengan nilai IC₅₀ 5,2 ppm sedangkan untuk ekstrak *n*-heksana adalah 43,0 ppm. Bila dilihat dari ketentuan derajat sitotoksitas suatu zat uji terhadap sel Murine P-388 adalah sangat sitotoksik jika IC₅₀ < 2 µg/mL, aktif jika nilai IC₅₀ 2-4 µg/mL untuk senyawa murni, dan IC₅₀ < 20 µg/mL untuk ekstrak (10), maka ekstrak alkaloida kasar bersifat aktif sedangkan ekstrak *n*-heksana tidak aktif. Sementara itu ekstrak dikatakan aktif sebagai antimalaria jika memberikan nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm (11), maka ekstrak *n*-heksana dan alkaloida kasar dari kulit batang *A. macrophylla* kedua-duanya bersifat aktif sebagai antimalaria dengan nilai IC₅₀ 1,824 dan 0,1 ppm. Aktivitas antimalaria juga diperlihatkan oleh ekstrak alkaloid kulit batang *A. sphaerocarpa* yang telah dilakukan sebelumnya dengan nilai IC₅₀ 2,5 x 10⁻⁶ ppm (6). Hasil penelitian antimalaria lainnya yang pernah dilaporkan sebelumnya mendapatkan bahwa alkaloida aporfin seperti norcorydin dan alkaloida bisbenzilisokuinolin seperti dehatrin dan (+)-costaricin mempunyai aktivitas antiplasmodium (12,13,14). Penelitian lainnya menemukan dua diterpen tipe cassana dan norcassana, dari *Caesalpinia crista* (familia Fabaceae) yang tumbuh di Indonesia, mempunyai aktivitas antimalaria dengan nilai IC₅₀ antara 90 nM sampai 6,5 µM (15). Penelitian sebelumnya tentang sitotoksitas pada ekstrak alkaloida *Actinodaphne pruinosa* terhadap sel Murine P-388 memberikan nilai IC₅₀ 5,1 ppm. Isolasi senyawa dari ekstrak alkaloida kulit batang *A. pruinosa* tersebut, mendapatkan alkaloida aporfin baru, (+)-N-(2-hidroksipropil) lindcarpin, yang bersifat sitotoksik terhadap sel Murine P-388, dengan IC₅₀ 3,9 ppm, disamping itu

dari kulit batang tumbuhan ini juga ditemukan beberapa alkaloida aporfin yang telah dikenal yaitu (+)-boldin, (+)-norboldin, (+)-lindcarpin, dan (+)-metillindcarpin (7). Hasil evaluasi dari aktivitas sitotoksik beberapa alkaloida aporfin lain dari *Stephania pierrei* (familia Menispermaceae) menunjukkan bahwa, (-)-dicentrin, (-)-nor-dicentrin, dan (-)-fanostenin aktif terhadap sel Murine P-388 dengan nilai ED₅₀ < 1 ppm (16).

Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka aktivitas dari ekstrak alkaloida kasar *A. macrophylla* dalam penelitian ini kemungkinan dari jenis alkaloida aporfin dan bisbenzilisokuinolin. Demikian pula dengan aktivitas yang diperlihatkan oleh ekstrak *n*-heksana kemungkinan disebabkan oleh senyawa-senyawa terpen, karena senyawa-senyawa ini dapat tersari dalam pelarut non polar seperti *n*-heksana. Hal ini didukung dengan hasil penapisan fitokimia yang menunjukkan adanya kandungan alkaloida dan triterpenoid dalam serbuk kulit batang *A. macrophylla*. Bila dilihat dari tempat tumbuh yang berbeda, maka tidak menutup kemungkinan akan ditemukan senyawa-senyawa aktif yang baru. Oleh karena itu penelitian ini perlu dilanjutkan ke tahap isolasi senyawa-senyawa aktif dari ekstrak yang mempunyai bioaktivitas tinggi sehingga diperoleh senyawa yang mempunyai potensi sebagai antikanker dan antimalaria.

KESIMPULAN

Ekstrak *n*-heksana kulit batang *A. macrophylla* bersifat aktif terhadap larva udang dengan nilai LC₅₀ 85,11 ppm dan terhadap *P. falciparum*

dengan nilai IC_{50} 1,824 ppm, namun tidak aktif terhadap sel Murine P-388 dengan nilai IC_{50} 43,0 ppm. Sementara itu ekstrak alkaloida kasar kulit batang *A. macrophylla* bersifat aktif terhadap larva udang dengan nilai LC_{50} 36,31 ppm, terhadap sel Murine P-388 dengan nilai IC_{50} 5,2 ppm, dan terhadap *P. falciparum* dengan nilai IC_{50} 0,1 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

1. Backer CA, Van Den Brink BRC. *Flora of Java (Spermatophytes only)*. NV.P. Noordhoff-Groningen-Netherlands 1963; 1: 124-125.
2. Sosef MSM, Hong LT, Prawirohatmodjo S(editors). *Plant Resources of South-East Asia, Timber trees: Lesser-known timbers*. Prosea, Bogor Indonesia; 1998; 5 (3): 45-47.
3. Kostermann AJGH. Lauraceae. *Reinwardtia* 1957; 4: 234-235.
4. Kim MR, Jung HJ, Min BS, Oh SR, Kim CS, Ahn KS, Kang WS, Lee HK. Constituents from the stems of *Actinodaphne lancifolia*. *Phytochemistry* 2002; 59: 861-865.
5. Burkill IH, Birtwistle W, Foxworthy FW, Scrivenor JB, Watson JG. *A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula*. Governments of The Straits Settlements and Federated Malay States 1935; 1: 42-43.
6. Rachmatiah T. Ekstraksi Alkaloida dari *Actinodaphne sphaerocarpa* (BL) Nees dan *A. pruinosa* Nees serta uji bioaktivitasnya terhadap *Artemia salina*, *Plasmodium falciparum* dan sel Murine P-388, Prosiding II, Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXXVII, Universitas Bengkulu. 2009; 425-429.
7. Rachmatiah T, Mukhtar MR, Nafiah MA, Hanafi M, Kosela S, Morita H, Litaudon M, Awang K, Omar, H and Hadi AHA. (+)-N-(2-Hydroxypropyl)lindcarpine: A new cytotoxic Aporphine Isolated from *Actinodaphne pruinosa* Nees. *Molecules* 2009; 14: 2850-2856.
8. Meyer BN, Ferrighi NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE & McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 1982; 45: 31-34.
9. Colegate SM, Molyneux RJ. *Bioactive Natural Products, Detection, Isolation, and Structural Determination*. CRC Press Boca Raton-Ann Arbor-London-Tokyo 1993; 15-25: 442-446.
10. Alley MC, Scudiero DA, Monks AM, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Research* 1988; 48: 589-601.
11. Köhler I, Jenet-Siems K, Siems K, Hernandez MA, Ibarra RA, Berendsohn WG, Brienze U, and Eckart E. In vitro Antiplasmodial Investigation of Medicinal Plants from El Savador. *Z. Naturforsch* 2002; 57: 277-281.
12. Kitagawa I, Minagawa K, Zhang R, Hori K, Doi M, Inoue M, Ishida T, Kimura M, Uji T, and Shibuya H. Dehatrine an Antimalarial Bisbenzylisoquinoline alkaloid from the Indonesian Medicinal Plant *Beilschidia Madang*, Isolated as a Mixture of Rotational Isomers. *Chem. Pharm. Bull* 1993; 41(5): 997-999.
13. Wright CW, Marshall SJ, Russell PT, Anderson MM, Phillipson JD, Kirby GC, Warhurst DC, Schiff Jr PL. In Vitro Antiplasmodial, Antiamoebic, and Cytotoxic Activities of Some Monomeric Isoquinoline Alkaloids. *J. Nat. Prod* 2000; 63 (12): 1638-1640.
14. Bohlke M, Guinaudeau H, Angerhofer CK, Wongpanich V, Soejarto DD, Farnsworth NR, Mora GA, Poveda LJ. Costaricine, a New Antiplasmodial Bisbenzylisoquinoline Alkaloids from *Nectandra salicifolia* Trunk Bark. *J. Nat. Prod* 1996; 59 (6): 576-579.
15. Linn TZ, Awale S, Tezuka Y, Banskota AH, Kalauni SK, Attamimi F, Ueda J, Asih PBS, Syafruddin D, Tanaka K, Kadota S. Cassane- and Norcassane-Type Diterpenes from *Caesalpinia crista* of Indonesia and their Antimalarial Activity against the Growth of *Plasmodium falciparum*. *J. Nat. Prod* 2005; 68 (5): 706-710.
16. Likhitwitayawuid K, Angerhofer CK, Chai H, Pezzuro JM, Cordell GA, Ruangrunsi N. Cytotoxic and Antimalarial Alkaloids from the Tubers of *Stephania pierrel*. *J. Nat. Prod* 1993; 56 (9): 1468-1478.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Pemerintah Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini melalui DP2M, DIKTI, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan dalam program Hibah Penelitian Fundamental.

Aktivitas Senyawa Isolasi Daun Surian terhadap Disfungsi Sel Endotel Hiperkholesterolemia

Suhatri, Yanwirasti, Dachriyanus, dan Ellyza

ABSTRACT: *The protective effects of isolated compounds of ethyl acetate fraction of surian's leaf (Toona sureni BL Merr) towards endothelial cell dysfunction on hypercholesterolemia have been investigated. Hypercholesterolemia was induced by atherogenic cocktail for the duration of 60 days. The protective effect was determined by Endothelial Derivate Relaxing Factor (EDRF/NO) concentration. The results showed that isolated compounds of ethyl acetate fraction of surian's leaf was able to protect the endothelial cell damage in hypercholesterolemia that can be seen by increasing the bioavailability of NO serum ($P < 0.05$).*

Keywords: *flavonoid, cocktail, hypercholesterol and nitrogen mono oxide (EDRF)*

ABSTRAK: Telah diteliti efek proteksi senyawa hasil isolasi fraksi etil asetat daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap disfungsi sel endothelia pada keadaan hiperkolesterolemia. Hiperkolesterolemia dibuat dengan memberikan selama 60 hari koktail aterogenik. Adanya efek proteksi terhadap sel endothelia yang diamati dengan menggunakan parameter kadar *Endothelial Derivate Relaxing Factor* (EDRF/NO). Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi fraksi etil asetat daun (*Toona sureni* BL Merr) dapat memproteksi kerusakan sel endothelia pada keadaan hiperkolesterolemia di tunjukan dengan meningkatkan bioavailabilitas NO serum ($P < 0,05$).

Kata kunci: flavonoid, koktail, hiperkolesterol dan nitrogen mono oksida (EDRF)

S2 Biomedik Ilmu Kedokteran
Pascasarjana Universitas Andalas

Korespondensi:

Suhatri

Email : suhatriaini@rocketmail.com

PENDAHULUAN

Disfungsi endotel berperan penting pada patogenesis, perkembangan, dan prognosis dari penyakit kardiovaskuler. Faktor risiko penyebab terjadi disfungsi sel endotel antara lain: hipertensi, merokok, diabetes, umur, obesitas, displipidemia, dan *sedentary life style*. Sebagian besar proses sistemik yang menginduksi disfungsi endotel adalah mengaktifasi intracellular oxidative signaling (1,2).

Jika sel endotel mengalami gangguan oleh berbagai hal seperti *shear stress* hemodinamik, stress oksidatif maupun paparan dengan sitokin inflamasi dan hiperkolesterolemia, maka fungsinya sebagai pengatur menjadi abnormal dan disebut disfungsi endotel. Disfungsi sel endotel sering diartikan menurunnya daya vasodilatasi pembuluh darah, karena terjadi penurunan produksi dan bioaktivitas faktor vasodilatasi lokal, khususnya nitric oxide (NO) atau nama lainnya *Endothelium Derivate Relaxing Factor* (EDRF) (3).

Kadar kolesterol dalam darah meningkat (hiperkolesterol) akan menyebabkan molekul *low density lipoprotein* (LDL) mudah teroksidasi, sehingga terbentuk gugus hidroksil pada sel endotel dan otot polos pembuluh darah. Radikal hidroksil ini akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh (*polyunsaturated fatty acid*) yang merupakan struktur dari membran sel termasuk sel endotel sehingga dapat menimbulkan reaksi peroksida lipid yang akan menghasilkan lipid peroksid LDL. Lipid peroksid yang terbentuk akan merusak sel endotel pembuluh darah (*disfungsi sel endothelia*), sehingga dapat menghambat pelepasan *Endothelium Derived Relaxing Factor* (EDRF) yaitu Oksida mono nitrat (NO) (3).

Tumbuhan Surian (*Toona sureni* (Blume) Merr.) banyak mengandung senyawa kimia. Akar dan daunnya kaya akan karotenoid, asam amino dan vitamin. Beberapa penelitian terdahulu diketahui bahwa daun surian mengandung senyawa flavonoid (kuersetin), terpenoid (tetranortriterpenoid yaitu surenon dan surenin) (4), steroid dan saponin. dari penelitian terbaru terhadap

fraksi etil asetat dari daun surian diketahui memiliki kandungan senyawa flavonoid dan aktif sebagai antioksidan yang diuji dengan Metoda DPPH (5,6).

Flavonoid memiliki aktivitas sangat luas diantaranya sebagai antioksidan. Sebagai anti agregasi, vasodilatasi, menurunkan resiko penyakit kardiovaskular dengan menstabilkan dan memproteksi sel endotelium dari stress oksidatif dan berefek anti inflamasi yang di induksi asam linoleat (7). Menurut Pratt dan Hudson 1990 senyawa anti oksidan alami terdiri dari senyawa fenolik, polifenol yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam-asam organik polifungsional. Menurut Pratt 1992 golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, kateksin, dan kalkon (8,9) Fraksi etil asetat daun surian ini terbukti mengandung senyawa fenolik dan flavonoid dan juga terbukti memiliki efek anti oksidan (6, 10).

Berdasarkan uraian ini dengan adanya aktivitas antioksidan senyawa yang terdapat dalam daun surian (*Toona sureni* BL Merr) dan obat yang telah ada menimbulkan efek samping pada beberapa orang maka akan dilakukan penelitian untuk membuktikan adanya efek proteksi oleh senyawa hasil isolasi fraksi etil asetat daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap kerusakan sel endothelia pada keadaan hiperkolesterolemia.

Pada penelitian ini dibuktikan adanya efek proteksi senyawa hasil isolasi fraksi etil asetat daun surian (*Toona sureni* BL Merr) terhadap kerusakan (disfungsi) sel endothelia dengan mengukur jumlah EDRF (NO), yang dihasilkan oleh sel endothelia secara in vivo.

METODE PENELITIAN

Bahan

Daun Surian (*Toona sureni* BL.Merr), Etanol 96 %, Serbuk Mg, HCL pekat, N- Heksana, Etil asetat, Metanol, Kloroform, Kloroform amoniak, NaCMC, air suling (aquadest), Silika gel PF 60 ukuran

40-63 nm, Makanan Standar Tikus (511), MLT, Gajah sapi, Minyak Sawit, *Propylthiourasil*, Cairan empedu ayam, dan Kit *Assay Designs™ Total Nitric Oxide Assay. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* Spektrofotometer *BIO-RAD*.

Alat

Botol maserasi, kapas, *rotary evaporator*, timbangan analitis, timbangan hewan, mortir, stamfer, jarum oral dan alat suntik, tabung sentrifuse dan rak tabung sentrifuse, kandang hewan, rak tabung reaksi, sentrifuse, botol *chamber*, alat gelas yang umum digunakan pada lab

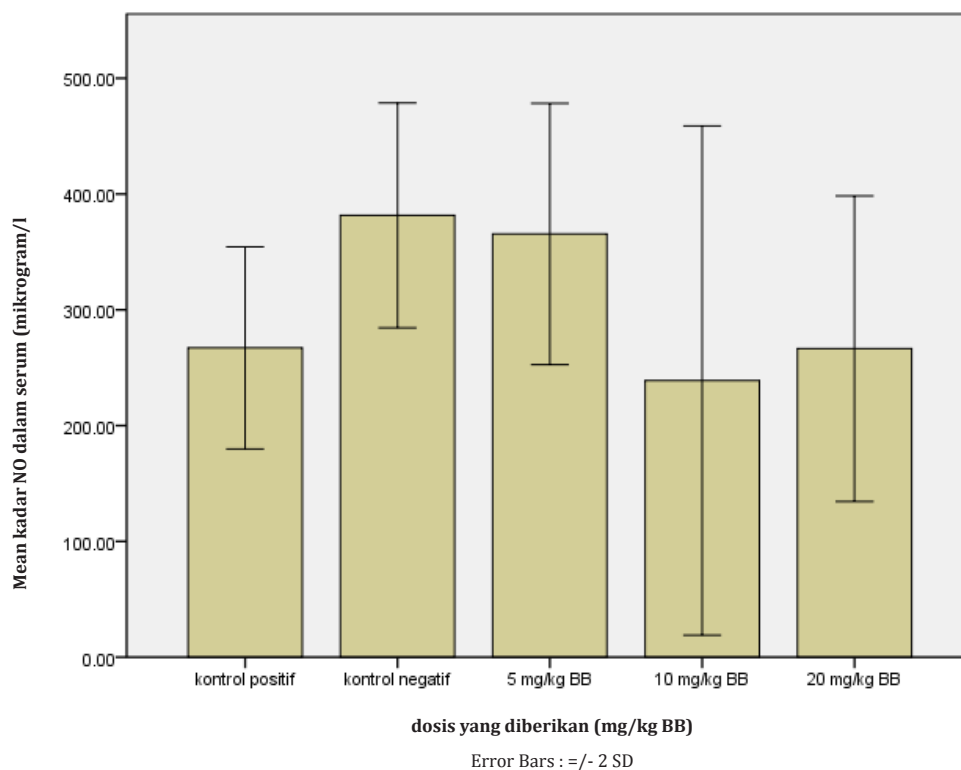
kimia, *cutter*, Kromatografi Kolom besar dan kecil, Plat KLT, Lampu UV 254 nm, Spektrofotometer Ultraviolet (UV), Fisher-Jhon Melting Point Apparatus, tempat makan dan minum tikus, Lemari pendingin dengan temperatur 4 C- 20 C., serta alat *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* Spektrofotometer *BIO-RAD*.

Persiapan Hewan percobaan

Hewan yang digunakan adalah Tikus (*Rattus Novergicus*) putih galur Wistar dengan bobot badan 200-250 gram, umur sekitar 300 gram.

Tabel 1 . Hasil Pengukuran Kadar Oksida Nitrogen NO

No Tikus	kadar NO (EDRF) dalam serum				
	kontrol positif	kontrol negatif	5mg/kg BB	10 mg/kg BB	20 mg/kg BB
1	222.57	433.55	424.85	419.74	375.78
2	231.73	311.78	330.97	126.06	200.75
3	255.53	369.34	286.02	201.53	244.53
4	307.90	421.79	403.24	200.50	240.93
5	317.90	371.56	382.39	246.96	270.37
rata-rata ± SD	267.1260 ± 43.62654	381.6040 ± 48.57978	365.4940 ± 56.43889	238.9580 ± 109.96817	266.4720 ± 65.98610



Gambar 1. Grafik hubungan antara perlakuan dengan rata-rata kadar NO

Isolasi dan Pemurnian flavonoid dari fraksi etil asetat daun surian (*Toona sureni* (Blume) Merr)

Isolasi dilakukan pada Fraksi etil asetat dari daun surian, dikromatografi kolom dengan fasa diam silika gel dan fasa geraknya kombinasi pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol yang ditingkatkan kepolarannya dengan berbagai perbandingan (*Step Gradien Polarity*). Hasil kromatogram dengan KLT yang sama digabung sehingga diperoleh beberapa bagian. Kemudian masing-masing bagian ditentukan beratnya.

Perlakuan terhadap Hewan Percobaan

Penentuan kadar NO/EDRF

Ditentukan kadar NO/EDRF dalam serum setelah diberikan makanan tinggi kolesterol bersamaan senyawa hasil isolasi dari fraksi etil asetat daun surian dengan dosis 5 mg/kg BB, 10 mg/kg BB dan 20 mg/kg BB. Alat yang digunakan adalah spektrofotometer metoda ELISA dengan reagen Griss. Dihitung loncatan *optical density* (OD)(11).

Analisa data

Data kadar NO/EDRF dianalisa dengan ANOVA

1 arah. Kemudian dilanjutkan dengan DUNCAN. Kebermaknaan diambil pada $P < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Oksida Nitrogen (N.O) Serum.

Kadar Nitrogen mono oksida (NO) serum, kontrol positif, kontrol negatif dan yang diberi senyawa hasil isolasi dari fraksi etil asetat *Tsureni*, secara berurutan adalah dosis 5 mg/KgBB, 10 mg/kgBB, 20 mg/Kg BB, dan, secara berurutan adalah: 267.1260 ± 43.62654 ; 381.6040 ± 48.57978 ; 365.4940 ± 56.43889 ; 238.9580 ± 109.96817 ; 266.4720 ± 65.98610 (tabel 1 dan gambar 1)

Pada tabel 1 dan diagram terlihat bahwa kadar NO(EDRF) tikus hiperkolesterolemia (kontrol positif) kadar NO(EDRF) nya 267.1260 ± 43.63 nilai rendah jika dibandingkan dengan tikus yang hanya diberi makanan standar (kontrol negatif) yang nilainya 381.6040 ± 48.57978 . Hal ini dikarenakan sel endotel pembuluh darah tikus hiperkolesterol mengalami disfungsi, sehingga

Tabel. 2 Uji Anova

ANOVA					
kadar NO dalam serum(mikrogram/l	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	84011.867	4	21002.967	4.395	.010
Within Groups	95583.127	20	4779.156		
Total	179594.994	24			

Tabel 3. Uji Duncan Homogeneous Subsets

kadar NO dalam serum(mikrogram/l				
	dosis yang diberikan (mg/kg BB)	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	10 mg/kg BB	5	238.9580	
	20 mg/kg BB	5	266.4720	
	kontrol positif	5	267.1260	
	5 mg/kg BB	5		365.4940
	kontrol negatif	5		381.6040
	Sig.		.550	.716

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

NO(EDRF) yang dihasilkan berkurang. Pemberian senyawa hasil isolasi dosis 10 mg/kgBB, 20 mg/Kg BB kadar NO (EDRF) nya dibawah NO (EDRF) tikus hiperkolesterol yaitu 238.9580 ± 109.96817 ; 266.4720 ± 65.98610 , hal ini berarti dosis ini tidak mampu memproteksi sel endotel dari kerusakan yang di induksi dengan hiperkolesterol pada tikus ini kadarnya malah dibawah normal, diduga bila dosis ditingkatkan malah menambah kerusakan sel endotel. Pada tikus yang diberikan senyawa hasil isolasi dari fraksi etil asetat *T. sureni* dosis 5 mg/KgBB terlihat memberikan efek proteksi terhadap disfungsi sel endotel, dengan ditandai kadar NO (EDRF) adalah $365,53 \pm 56,38$, kadar ini tinggi dibandingkan kontrol positif, dan kadar ini mendekati kadar NO (EDRF) tikus kontrol negatif 381.6040 .

Dari uji hasil menggunakan analisa ANOVA satu arah SPSS 17.0 didapatkan hasil bahwa uji hasil perhitungan statistic kadar NO ANOVA satu arah menunjukkan bahwa nilai F hitung 4.395 Sig = 0,010 (kecil dari 0,05) yang berarti bahwa pemberian senyawa hasil isolasi dari fraksi etil asetat *T. sureni* mempengaruhi kadar NO(EDRF) hewan percobaan (tabel 2).

Setelah dilakukan uji lanjut Duncan didapatkan hasil bahwa kadar NO (EDRF) dosis 5 mg/

kg BB dan kontrol Negatif, tidak berbeda karena keduanya terletak pada subset yang sama, dan berbeda dengan kontrol positif, dosis 10 mg/kg BB dan dosis 20 mg/kg BB, karena terletak pada subset yang berbeda (tabel 3).

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil isolasi dari fraksi etil asetat dapat memproteksi disfungsi sel endotel hanya dosis 5 mg/kg BB dan efek berkurang bila dosis ditingkatkan.

SARAN

Disarankan penelitian ini dilanjutkan untuk menentukan dosis efektif sebagai proteksi disfungsi sel endotel dengan menggunakan beberapa tingkatan dosis, tentu dibawah dosis 5 mg/kg BB.

UCAPAN TERIMAKASIH

Saya ucapkan terimakasih pada DIKTI yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lawrence, G.S.. *Implikasi Klinis Disfungsi Endotel dan Radikal Bebas*. Makassar: Unit Riset Vascular, bagian Patologi, FK Unhas, RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo; 2004.
2. Xi H, Akishita M, Nagai K, Yu W, Hasegawa H, Eto M, Kozaki K, Toba K.. Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis. *Atherosclerosis*; 2007.191: 281–289.
3. Simionescu M. Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 2007. 27: 266–274.
4. Kraus, W.K., *Surenol and Surenine*, Two Novel Tetraterpenoid From *Toona sureni* (BL) Merr; Tetrahedron Letter no 29, 1979: 2715-2717.
5. Romy. *Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol dan Hasil Fraksinasi Daun Surian (Toona sureni BL. Merr) secara in-vitro*. (Skripsi). Padang: Fakultas Farmasi, Universitas Andalas 2009.
6. Suhatri, Helmi A, Hadira F.L.I. " Efek proteksi ekstrak daun surian (*Toona sureni* BL. Merr) terhadap gangguan fungsi sel endotel pembuluh darah tikus", Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi, vol. 14, No2, 2009: 17-24.
7. Reiterer G, Michal T and Bernhard H. 2004. Quercetin Protects Against Linoleic Acid-Induced Porcine Endothelial Cell Dysfunction © 2004 The

- American Society for Nutritional Sciences J. Nutr. 134:771-775. Pratt,D.E. Natural Antioxidants From Plant Matrital. In In. M.T.Huang, C.T. Ho, Dan C.Y. Lee, editor. Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health H.American Society, Washington DC ; 1992.
8. Pratt,D.E. and B.J.F, Hudson. Natural Antioxidant not Exploited Comercially. In B.F.J.Hudson, ed. Food antioxidants. Elsvier Applied Science, London 1990.
9. Ekaprasada, M.T. *Penentuan Struktur Senyawa Karotenoid, Steroid, Fenolik dan Identifikasi Minyak Atsiri Daun Surian (Toona sureni BL. Merr.) serta Pengujian Bioaktivitasnya.* (Disertasi).: Program Pasca sarjana Universitas Andalas 2010.
10. Ghasemi, A., Hedayati, M., Biabani, H. Protein Precipitation Methods Evaluated for Determination of Serum Nitric Oxide End roducts by the Griess Assay. *Journal of Medical Sciences Research*, 2007.15: 29-32.

Identifikasi Senyawa Antikanker dari Fraksi Kloroform Kulit Batang *Bruguiera gymnorhiza* dan Aktivitas Sitotoksiknya

Warsinah¹, Sismindari², Ratna Asmah Susidarti²

ABSTRACT: *Bruguiera gymnorhiza* is one of mangrove plant that has not been widely studied as potential anticancer compounds. Previous research noted that the methanol extract of the bark of *B. gymnorhiza* are cytotoxic towards HeLa cells. The purpose of this study was to determine the compounds in the chloroform fraction and cytotoxic activity in HeLa cells. Stem bark of *B. gymnorhiza* was extracted with methanol, further fractionation by partitioning method, using of the solvent *n*-hexane and chloroform. Fraction of chloroform was evaporated, then tested cytotoxic activity against HeLa cells by MTT method and apoptotic induction by double staining method. Fraction levels are used for 500, 250, 125, 62.5 and 31.25 mg / mL with 24-hour incubation time. Subsequent fractions were identified by GC-MS method. The results showed that the chloroform fraction contains 21 compounds, 6 in the form of fatty acids and terpenoids that have anti-cancer cytotoxic activity (IC_{50}) of 134 μ g / mL with apoptotic mechanism.

Keywords: Apoptosis, *Bruguiera gymnorhiza*, cytotoxic, Fractionation, HeLa cell

ABSTRAK: *Bruguiera gymnorhiza* merupakan salah satu tanaman mangrove yang belum banyak diteliti senyawa yang berpotensi sebagai antikanker. Penelitian sebelumnya diketahui bahwa ekstrak metanol kulit batang *B. gymnorhiza* bersifat sitotoksik terhadap sel kanker HeLa. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui senyawa dalam fraksi kloroform dan aktivitas sitotoksiknya pada sel kanker HeLa. Kulit batang *B. gymnorhiza* diekstraksi dengan metanol, selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan metode partisi menggunakan pelarut *n*-heksan dan kloroform. Fraksi kloroform dievaporasi, kemudian diuji sitotoksiknya terhadap sel HeLa dengan metode MTT dan induksi apoptosis menggunakan metode double staining. Kadar fraksi yang digunakan sebesar 500, 250, 125, 62,5 dan 31,25 μ g/mL dengan waktu inkubasi 24 jam. Selanjutnya fraksi diidentifikasi dengan Gas Kromatografi Spektrum Massa (GC-MS). Hasil penelitian menunjukkan fraksi kloroform mengandung 21 senyawa, 6 diantaranya berupa asam lemak dan terpenoid yang bersifat antikanker dengan aktivitas sitotoksik (IC_{50}) sebesar 134 μ g/mL melalui mekanisme apoptosis.

Kata kunci: Apoptosis, *Bruguiera gymnorhiza*, Fraksinasi, Sel HeLa, Vaksinasi sitotoksik.

¹ Jurusan Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Unsoed Purwokerto

² Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Korespondensi:

Warsinah

Email : warsinah@rocketmail.com

PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu ancaman utama di bidang kesehatan di dunia kematian akibat penyakit kanker menduduki peringkat ke-2 setelah penyakit kardiovaskuler (1). Kematian akibat kanker di Indonesia mencapai 4,3% atau menduduki peringkat ke-6 (2).

Sel kanker merupakan sel yang tumbuh tidak terkendali dan lepas kontrol dari koordinasi pertumbuhan normal sehingga mengalami perubahan bentuk, sifat dan kinetiknya. Perubahan tersebut terjadi karena mutasi gen pengatur pertumbuhan dan diferensiasi proto-onkogen atau supresor gen (3).

Berbagai usaha dilakukan untuk mencegah dan menyembuhkan penyakit kanker, salah satu usaha yang sedang intensif dilakukan adalah melalui pencarian senyawa antitumor dari bahan alam (4).

Beberapa penelitian melaporkan bahwa bahan-bahan dari tanaman ternyata mempunyai potensi sebagai regulator negatif onkogen dan regulator positif gen tumor supresor, sehingga berpotensi sebagai antikanker (5).

Mangrove merupakan tumbuhan yang hidup di pantai, dapat dijadikan sumber senyawa bio-aktif seperti golongan tanin, saponin, terpenoid, alkaloid dan steroid dengan aktifitas antimikroba, fungi, virus, tumor, insektisida dan leukemia (6). Pemanfaatan tanaman mangrove sebagai bahan obat tradisional digunakan oleh masyarakat dalam terapi penyakit gastroenteritis dan anti kanker (7).

Chen, *et al.* (2007), melaporkan fermentasi akar *B. gymnorhiza* dengan *Penicillium thomii* menghasilkan senyawa 4',5-dihidroksi-2-3-dimetoksi-4- (hidroksipropil)-biphenil bersifat sitotoksik terhadap 3 sel kanker (A549, HepG2 dan HT29). Homhual *et al.* (2006), Bunga *B. gymnorhiza* mengandung senyawa sulfur yaitu senyawa cyclic 4-hidroksi-dithiosulfonat (bruguisulfurrol), hidroksidithiolane 1-oksida (bruguirol) dan isobruguirol dengan respon antioksidan dengan nilai EC_{50} 56,7; 3,7 dan 1,8 μ M. Senyawa brugui-

erol dan isobruguirol mampu menghambat phorbol ester-induksi NF-kappaB (nuclear factor -kappaB) dengan IC_{50} 85 dan 14,5 μ M. Senyawa bruguirol juga mampu menghambat enzim COX-2 dengan IC_{50} 6,1 μ M.

Warsinah, *et al* (2005) melaporkan bahwa ekstrak etanol kulit batang *B. gymnorhiza* mampu menghambat pertumbuhan sel kanker HeLa dengan nilai IC_{50} sebesar 301,78 μ g/mL dan sel Myeloma dengan IC_{50} sebesar 582 μ g/mL secara *in vitro* (12). Selanjutnya warsinah, *et al* (2007) menunjukkan bahwa ekstrak metanol mampu menghambat pertumbuhan sel HeLa dengan IC_{50} sebesar 228,8 μ g/mL (13).

Pencarian bahan obat antikanker dari alam umumnya ditekankan pada senyawa aktif yang memiliki kemampuan menekan proliferasi sel, mempunyai efek sitotoksik, antimitotik atau memiliki kemampuan menginduksi sel secara apoptosis. Kematian sel secara terprogram disebut apoptosis. Gen yang berperan dalam peristiwa apoptosis adalah gen P53, gen ini berperan sebagai supresor tumor (14). Senyawa antitumor yang baik adalah senyawa yang dapat menginduksi terjadinya apoptosis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa yang terdapat pada fraksi kloroform dan aktifitas sitotoksik dari kulit batang *Bruguiera gymnorhiza* pada sel kanker leher rahim HeLa.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Tanaman *B. gymnorhiza*, kultur HeLa, media RPMI (RPMI 1640 (Sigma), natrium bikarbonat (Sigma) dan hepes (Sigma), *fetal bovin serum* (FBS) (Gibco) 10% (v/v), penisilin-streptomisin (Gibco) 1% (v/v), fungison (Gibco) 0,5% (v/v), aquades steril, DMSO, akridin oranye, etidium bromida, sodium dodesil sulfat (SDS), *reagen stopper* (natrium dodesil sulfat) (merck) 10% dalam HCl), MTT 5 mg/mL dalam FBS, dan semua pelarut pro analisis (E Merk).

Cara Kerja

Fraksinasi

Ekstrak kental metanol kemudian difraksinasi secara partisi dengan pelarut n-heksan dan kloroform. Fraksi kloroform tersebut kemudian di uji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker HeLa dengan metode MTT, induksi apoptosis dengan metode double staining dan identifikasi senyawa dengan GC-MS.

Identifikasi senyawa dengan GC-MS

Sampel dimasukkan kedalam system pemasukan cuplikan spectrometer massa, pada spektra massa yang terbentuk diamati bobot molekul beserta fragmen-fragmennya dibandingkan dengan spektra referensi.

Pembuatan larutan uji

Fraksi dibuat stok 10 mg/mL dengan dilarutkan dalam larutan DMSO 1,25%. Kemudian dibuat seri kadar sampel dalam media RPMI 1640 masing-masing dengan konsentrasi 500, 250, 125, 62,5 dan 31,25 µg/mL. Pembuatan larutan

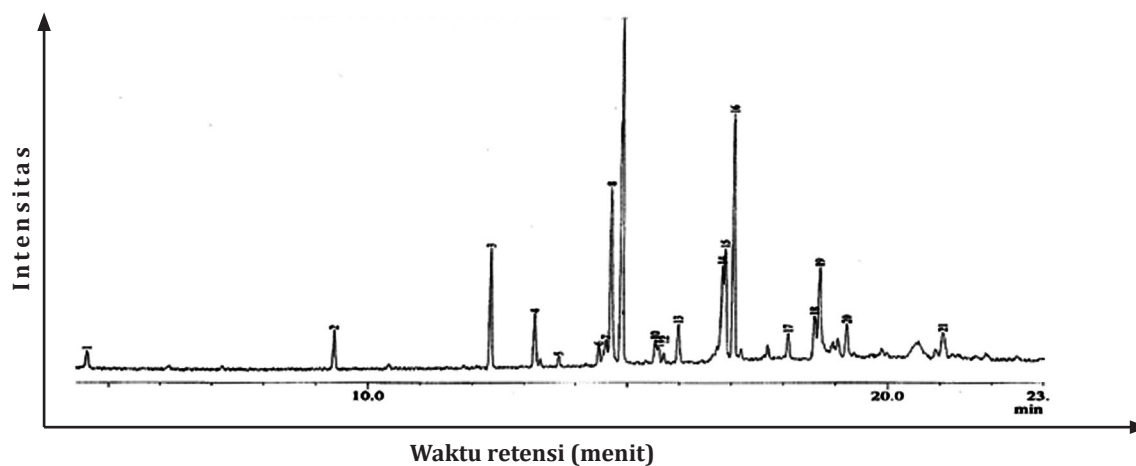
uji dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* secara aseptis.

Uji sitotoksis dengan metode MTT

Sel Kanker HeLa dengan kepadatan $2 \times 10^4/100$ uL didistribusikan ke dalam sumuran pada 96-well plate dan diadaptasikan, kemudian ditambah sampel uji dengan kadar masing-masing 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL dan 31,25 µg/mL. Sebagai kontrol digunakan 100 l suspensi sel ditambah media. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 24 jam. Pada akhir inkubasi ditambahkan 10 µl MTT 5 mg/mL dalam RPMI ke dalam sumuran. Kemudian diinkubasi 4 jam pada suhu 37°C. Sel hidup akan berwarna ungu setelah bereaksi dengan MTT, selanjutnya reaksi dihentikan dengan *reagen stopper* kemudian di inkubasi semalam pada suhu kamar, absorbansi dibaca dengan *ellisa reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Analisis Data

Data spectra dari hasil pembacaan GC-MS di-



Gambar 1. Kromatogram fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza*

Tabel 1. Kandungan senyawa antikanker pada fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza*

No	No puncak	Waktu retensi	% area	Rumus molekul	Nama senyawa	Golongan senyawa
1	3	12,348	7,38	C15H30O2	Methyl myristat	terpenoid
2	4	13,197	3,41	C19H38O2	Methyl isostearat	Asam lemak
3	8	14,675	12,23	C17H32O2	Methyl palmitoleat	Asam lemak
4	9	14,880	21,05	C17H34O2	Methyl palmitat	Asam lemak
5	15	16,876	6,99	C19H36O2	Methyl oleat	Asam lemak
6	16	17,044	14,90	C20H40O2	Nonadecanoat	terpenoid

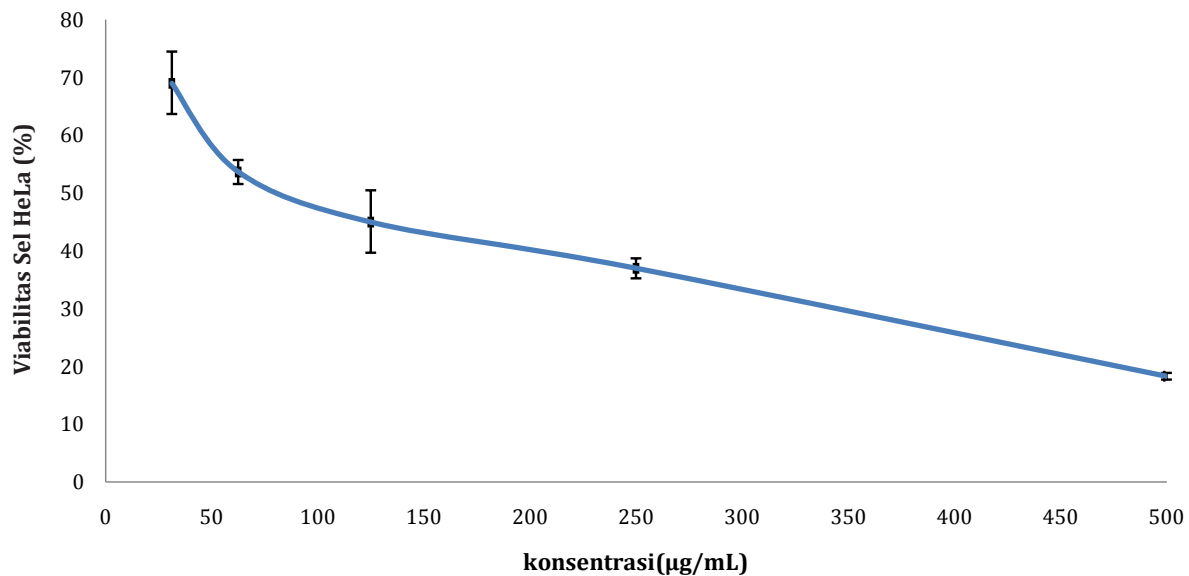
analisis secara deskriptif kualitatif dan data sitotoksik dari hasil pembacaan absorbansi *ELIZA Reader* dikonversikan dalam bentuk % sel hidup dengan cara sebagai berikut:

$$\% \text{ hidup sel} = \frac{\text{Absorban sel perlakuan} - \text{Absorban media}}{\text{Absorban kontrol sel} - \text{Absorban media}} \times 100\%$$

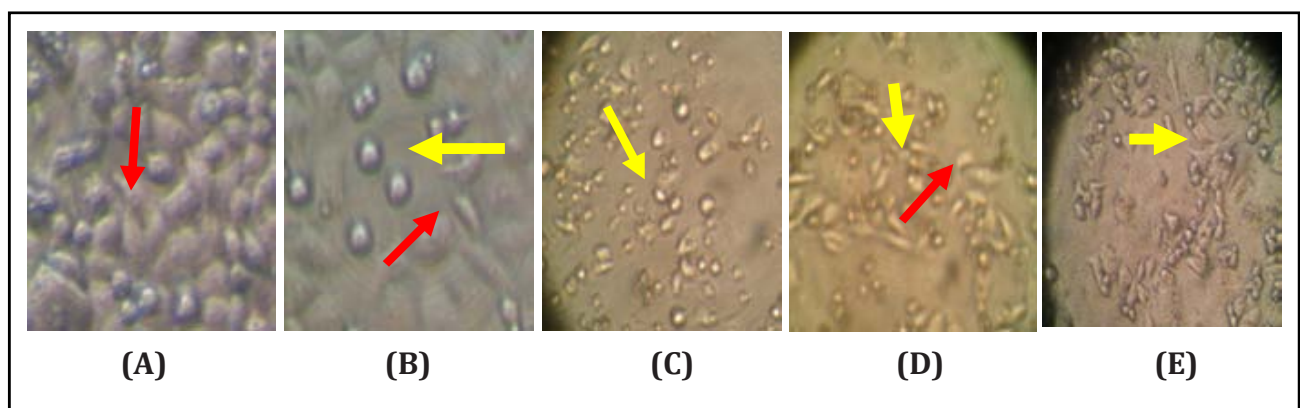
Potensi aktivitas sitotoksik direpresentasikan sebagai harga IC_{50} yang dihitung menggunakan analisis probit, semua data disajikan dalam bentuk mean $\pm$ SD.

HASIL DAN PEMBAHASAN

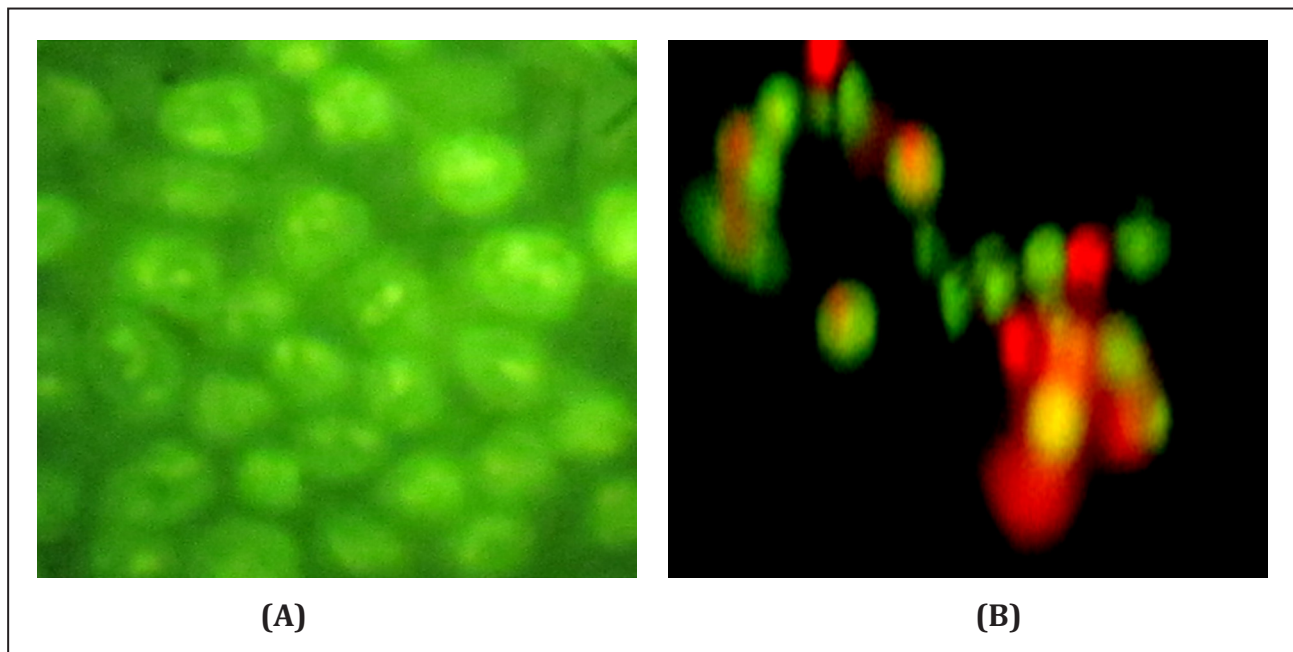
Fraksinasi ekstrak metanol secara partisi menggunakan pelarut n-heksan dan klorofom. Hasil yang diperoleh ternyata hanya pelarut kloroform yang dapat mengekstrak senyawa aktif pada ekstrak metanol kulit batang *B. gymnorhza*. Fraksi yang terekstrak dalam pelarut n-heksan jumlahnya sangat sedikit sehingga dalam pengujian selanjutnya hanya fraksi kloroform yang diuji.



Gambar 2. Konsentrasi fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhza* terhadap viabilitas sel HeLa (%). Konsentrasi yang digunakan 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, dan 31,25 µg/mL. Inkubasi dilakukan selama 24 jam dalam inkubator 5% CO₂ dengan suhu 37°C. Jumlah sel yang hidup dihitung menggunakan metode MTT.



Gambar 3. Morfologi sel HeLa setelah inkubasi 24 jam. Sel kontrol (A), sel dengan perlakuan DMSO 1,25% (B), sel dengan perlakuan fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhza* konsentrasi 500 µg/mL (C), 250 µg/mL (D) dan 125 µg/mL (E). sel hidup (panah merah) melekat didasar sumuran berbentuk helaian daun dan sel mati (panah kuning) sel mati berbetuk bulat, mengapung dan keruh. Pada perlakuan fraksi kloroform banyak ditemukan sel mati



Gambar 4. Morfologi sel HeLa dengan pengecatan DNA menggunakan metode double staining akridine orange - etidium bromida, pengamatan dilakukan dibawah mikroskop flouresens. (A) Sel kontrol memperlihatkan warna hijau terang yang sama dan berbentuk bulatan (panah merah) yang menandakan bahwa sel masih hidup, (B) perlakuan fraksi kloroform sel HeLa terlihat berwarna orange dengan bentuk yang tidak teratur (panah putih) yang mengindikasikan sel mengalami apoptosis

Fraksi kloroform tersebut kemudian diidentifikasi dengan GC-MS, Data kromatogram fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* ditampilkan pada gambar 1.

Dari kromatogram diketahui bahwa fraksi kloroform mengandung 21 senyawa, enam diantaranya bersifat antikanker (tabel 1).

Aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa

Hasil uji sitotoksik fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* pada kultur sel HeLa selama 24 jam memberikan hasil berupa penurunan sel hidup bersamaan dengan peningkatan kadar disajikan pada gambar 2. Dari kurva tersebut dibuat persamaan regresi linier. Persamaan regresi linier yang didapat adalah $y = -0,0915x + 61.588$ dengan $R^2 = 0.9632$. Nilai IC_{50} dihitung secara interpolasi menggunakan rumus tersebut sehingga diperoleh angka 134 $\mu\text{g/mL}$.

Pada pengamatan morfologi sel HeLa kontrol terlihat melekat didasar sumran dengan bentuk helaian daun, demikian pula kontrol DMSO

1,25% memberikan bentuk seperti pada kontrol. Adanya perlakuan fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* menyebabkan terjadinya perubahan morfologi sel HeLa. Sel yang mati berbentuk bulat, dan tampak keruh (gambar 3).

Selain itu perubahan sel juga dilihat secara morfologi, ternyata sel yang mati seiring dengan peningkatan konsentrasi yang diberikan pada sel uji. Hasil pengamatan morfologi sel dapat dilihat pada gambar 3.

Uji Induksi Apoptosis

Hasil uji induksi apoptosis dengan pengecatan DNA menggunakan metode double staining memperlihatkan warna hijau terang pada kontrol sel (gambar 4). Sel hidup yang masih mempunyai membran yang utuh, nukleusnya akan berwarna hijau terang (10), sedangkan pada sel dengan perlakuan fraksi kloroform (150 $\mu\text{g/mL}$) memperlihatkan warna yang tidak sama yaitu warna hijau bercampur orange yang mengindikasikan terjadinya apoptosis. Menurut Spector (1998), ada-

nya fragmentasi DNA sel kanker dengan pewarnaan etidium bromida menyebabkan terjadinya interkalsi antara DNA dengan zat warna etidium bromide sehingga sel mengalami apoptosis.

Potensi fraksi kloroform dalam memacu apoptosis sel kemungkinan karena adanya asam lemak dan senyawa terpenoid. Hal ini sesuai dengan penelitian pendahuluan (12), bahwa didalam ekstrak metanol kulit batang *B. gymnorhiza* mengandung senyawa terpenoid. Menurut Cassady *et al.* (1990). Diterpen dilakton mampu menghambat pertumbuhan *cell lung* tumor (A-549) dan sel kanker kolon secara invitro (15). Miao *et al* (2003) melaporkan bahwa senyawa diterpenoid kuinon salvacina memiliki aktivitas inhibitor pada enzim topoisomerase II dan mempunyai efek induksi apoptosis terhadap sel leukemia. Penelitian ini dilakukan menggunakan isolasi DNA total dan fragmentasi DNA diamati dengan metode elektroporesis. Apabila aktivitas topoisomerase dihambat maka stabilitas kompleks topoisomerase-DNA terpotong sehingga menimbulkan kerusakan permanen pada *double strand* DNA (17). Sukardiman (2005) melaporkan bahwa senyawa andrografolida dari sambiloto (*Andrographis paniculata*) merupakan senyawa diterpenoid yang memiliki gugus -OH bebas pada C-2, C-3 dan adanya gugus lakton

atau kuinon sebagai gugus fungsi yang bertanggung jawab pada proses ikatan reseptor dengan obat sehingga menyebabkan kematian sel kanker HeLa dengan mekanisme apoptosis (18). Willye (2000) mengatakan bahwa asam lemak dapat mematikan sel kanker dengan mekanisme apoptosis dan Cascady *et al* (1990), asam palmitat dan asam oleat mampu menghambat pertumbuhan sel kanker *lung*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa fraksi kloroform kulit batang *B. gymnorhiza* mengandung 6 senyawa antikanker dan memiliki aktivitas antikanker dengan harga IC₅₀ sebesar 134 µg/mL melalui mekanisme apoptosis. Selanjutnya perlu dilakukan uji aktivitas terhadap ekspresi gen yang bertanggungjawab pada proses apoptosis sel kanker HeLa secara invitro.

UCAPAN TERIMA KASIH

Disampaikan Kepada DP2M Ditjen DIKTI Kemendiknas yang telah membiayai penelitian ini melalui program penelitian Hibah Bersaing.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim. Health Information for World. World Health Organisation. (online); 2005: <http://diahome.org/content/abstract/2005/dij991.pdf>.
2. Tjindarbumi D. and Mangunkusumo R. Cancer in Indonesia, Present and Future., Jpn J Clin Oncol. 2002. 32 (supplement 1). S17-S21
3. Sukardja IDG. Onkologi klinik Edisi II. Surabaya: Airlangga University Press; 2000.
4. Ma'at S. Obat Tradisional Untuk Pelayanan Kesehatan Formal. Prosiding Seminar Nasional Tanggal 5 September. Surabaya; 2004: 45-49.
5. Cardenas ME, Sanfridson A, Cuter NS, and Heitman J. Signal Transduction Cascade as targets For Therapeutics Intervention by natural Products. Tibtech. 1998 Oct. 16. 427 - 433
6. Soetarno, S. Potensi dan Manfaat Tumbuhan Mangrove sebagai Sumber Bahan Bioaktif. Acta Pharmaceutica Indonesia. 2000. 12(4). 84- 103.
7. Saputra K, Ma'at S, and Soedoko, R. Terapi Biologi Untuk Kanker. Surabaya: Airlangga University Press; 2000.
8. Chen G, Zhu Y, Wang HZ, Wang SJ, Zhang RQ. The Metabolites of a mangrove endopathytic fungus, penicillium thomi. J. Asian Natural Product Research. Vol 9. 159-164.
9. Homhual S, Zhang HJ, Bunyapraphatsara. N, Kon-

- dratyuk TP, Santar Siero BD, Mesear AD, Herunsalee A. Chaukul W, Pezzuto JM, Fong HH. Brugiesulfurool, a new compound from *Bruguiera gymnorhiza*, *Planta med*, Departement of Pharmacognosy Bangkok:, Fakulty of Pharmacy Mahidol University Thailand; 2006.
10. McGahon Aj, Martin SJ, Bissonnete RP, Mahboubi M, Shi Y, Mogil R J, Nishioka WK, Green DR. The End of The (Cell) Line; Methode for the Study of Apoptosis in Vitro, in Schwartz, L.M, Osbome BA. Cell Death, Methods in cell Biology Vol 46, San Diego: Academic Press; 1995
11. Spector D. Cells, A Laboratory manual, subcellular localization of genes and their product, volume 3, Cold Spring Harbor. USA: Labolatory Press; 1998.
12. Warsinah Puji L., Trisnowati. Isolasi Terpenoid pada tananam *B. gymnorhiza* Sebagai Bahan Antikanker. Laporan Penelitian Dasar; 2005.
13. Warsinah, Hartiwi Diastuti, Suwandri. Isolasi Senyawa Bioaktif pada Kulit Batang *B. gymnorhiza* Sebagai Bahan Antikanker. Laporan Penelitian Hibah bersaing; 2007.
14. Wyllie A, Donahue V, Fisher B, Hill D, Keeseey J, Manzow S. Cell Death Apoptosis and Necrosis. Rosche Diagnosis Cooperation. 2000. 2-64
15. Cassady JM, Baird W, and Chang CJ. Natural products as a Source of Potential Cancer Chemotherapeutic and chemopreventive Agents. *Journal of Natural products*. 1990. 53(1) 34.
16. Miao ZH, Qing Chen, Tong ian Jiang, Zhang Jin, Sheng Dig Jian. Cytotoxic, apoptosis induction and down regulation of MDR1 expression by antitopoisomerase II agent, salvicine, in multidrug resistant tumor cells. *Int J cancer*. 2003. 160(1). 180-15
17. Beck Wt, Mo YY, Bhat UG. Cytotoxic Signalling by inhibitor of DNA topoisomerase II, *Biochemical Society*. 2001. 29 (6). 702-703
18. Sukardiman, Rahman A, Ekasari W, dan Sismin-dari. Induksi Apoptosis Senyawa *Andrographolida* dari *Sambiloto* (*Andrographis paniculata*) terhadap kultur sel kanker. *Media Kedokteran Hewan*. 2005. 1 (3). 105-110

Aktivitas Antibakteri dan Antimitotik dari Fungi yang Bersimbiosis dengan Spons

Wilmar Maarisit^{1,2*}, Marstella Minelko², Tan Tjie Jan²

ABSTRACT: *Sponge-derived fungi are source of natural bioactive compounds. The aim of this research is to test the anti-bacterial and anti-mitotic activities from marine sponge-derived fungus. The sponge-derived fungus (strain TID.24041021-2) has been successfully isolated from sponge (strain TID.24041021-2) collected from the sea around Tidung Island. The morphology of this fungus has been identified and classified in the genus Wangiella sp. This fungus was cultivated in PDA with salinity 25 ppm for 21 days at room temperature, extracted with acetone, partitioned with ethyl acetate, and tested the anti-bacterial activity against Bacillus subtilis, Escherichia coli, and Staphylococcus aureus, and also tested the anti-mitotic activity using root tip cells of Allium cepa. The results showed that crude extract of ethyl acetate could inhibit the growth of B. subtilis (1.30-2.30 mm), E. coli (1.50-3.03 mm) dan S. aureus (2.80-5.0 mm) bacteria. Also, anti-mitotic activity from crude extract of ethyl acetate showed that there is chromosome abnormalities of 0.79 and 1.38 in extract concentration of 20 % and 25%, respectively.*

Keywords: *Sponge-derived fungi, anti-bacterial, anti-mitotic, chromosome abnormalities.*

ABSTRAK: Fungi laut merupakan salah satu sumber senyawa bioaktif alami. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri dan antimitotik dari fungi yang bersimbiosis dengan spons. Fungi simbiosis spons (strain TID.24041021-2) telah berhasil diisolasi dari spons (strain TID.24041021) yang berasal dari perairan pulau Tidung. Identifikasi morfologi fungi menunjukkan kemiripan dengan genus *Wangiella* sp. Fungi dikultivasi pada medium PDA dengan salinitas 25 ppm selama 21 hari pada suhu ruang, diekstrak dengan aseton, dipartisi dengan etil asetat dan diuji aktivitas antibakteri dan antimitotik. Uji aktivitas antibakteri menggunakan *disc diffusion method* terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, sedangkan sel-sel akar *Allium cepa* digunakan untuk uji aktivitas antimitotik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar etil asetat dapat menghambat pertumbuhan bakteri *B. subtilis* (1.30-2.30 mm), *E. coli* (1.50-3.03 mm) dan *S. aureus* (2.80-5.0 mm), sedangkan aktivitas antimitotik dari ekstrak kasar etil asetat menunjukkan adanya abnormalitas kromosom sebesar 0.79 % dan 1.38 % pada konsentrasi ekstrak 20% dan 25 %.

Kata kunci: Fungi simbiosis spons, antibakteri, antimitotik, abnormalitas kromosom.

¹ Program Studi Ilmu Kelautan,
Fakultas Perikanan dan
Ilmu Kelautan-Universitas
Sam Ratulangi-Manado

² Program Studi Biologi,
Fakultas Sains dan Matematika,
Universitas Pelita Harapan-
Tangerang

Korespondensi:

Wilmar Maarisit

Email : wmaarisit@yahoo.com

PENDAHULUAN

Mikroorganisme laut khususnya fungi telah menjadi sumber penting dari senyawa metabolit farmakologis. Fungi laut dapat ditemukan pada beberapa sumber salah satunya adalah spons. Fungi dan spons membentuk suatu hubungan simbiosis baik di dalam inti sel spons (simbiosis intranukleus), di dalam sitoplasma sel tubuh spons (simbiosis intraseluler), di dalam tubuh spons (endosimbiosis ekstraseluler), dan di bagian luar tubuh spons (eksosimbiosis ekstraseluler). Hubungan simbiotik ini terjadi karena spons merupakan hewan yang bersifat *filter feeder* (1). Metabolit yang dihasilkan oleh spons merupakan hasil biosintesis dari mikroba simbiotiknya termasuk diantaranya adalah fungi (1). Senyawa-senyawa dari hasil biosintesis tersebut memiliki banyak fungsi biologis, salah satunya adalah anti-bakteri dan anti-mitotik.

Antibakteri adalah senyawa alami atau sintetik yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri patogen (2), sedangkan antimitotik adalah senyawa yang dapat menghambat pembelahan sel (3). Senyawa antimitotik dapat digunakan untuk pengobatan penyakit kanker karena sifatnya yang dapat menghambat mitosis dengan mengganggu pembentukan α dan β -tubulin pada mikrotubul (4). Mikrotubul memegang peranan penting saat proses mitosis, yaitu berfungsi untuk mengatur dan memisahkan kromosom (5). Senyawa antimitotik juga sering disebut sebagai senyawa antimikrotubul.

Penelitian tentang senyawa antibakteri dan antimitotik dari organisme laut khususnya fungi masih sangat terbatas. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan antimitotik dari fungi yang bersimbiosis dengan spons yang dikoleksi dari perairan pulau Tidung Kepulauan Seribu.

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Spons diambil dari perairan pulau Tidung pada

bulan April 2010, dengan kedalaman lima meter. Spons dipotong bagian pangkalnya menggunakan pisau dengan alat bantu *snorkel*, *goggle* dan *fins*, selanjutnya dimasukkan ke dalam kantung plastik steril dan disimpan dalam kotak pendingin (5-10°C). Sampel dibawa ke Laboratorium Biologi Universitas Pelita Harapan untuk diisolasi dan diidentifikasi fungi simbiotiknya.

Isolasi dan Kultivasi Fungi

Spons dibersihkan dengan air laut steril, dipotong kecil dan dimasukkan ke dalam medium PDB. Sampel diambil 1 mL dan disebarkan ke dalam medium PDA dengan salinitas 25 ppm. Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Isolasi monospesies fungi simbion dilakukan dengan cara menggoresnya berulang kali pada medium PDA salinitas 25 ppm. Hasil isolat fungi simbion diberi kode TID.24041021-2 dan selanjutnya dikultur dalam medium PDA salinitas 25 ppm selama 21 hari pada suhu ruang.

Ekstraksi Fungi

Fungi (TID.24041021-2) sebanyak 100 petridis, dimaserasi dengan aseton selama 24 jam dengan dua kali ulangan. Perbandingan aseton yang digunakan adalah 1:2 (w:v). Larutan yang diperoleh disaring dengan kertas saring dan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Hasil ekstraksi kemudian dipartisi dengan menggunakan etil asetat. Ekstrak etil asetat diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan difusi agar menggunakan metode *paper disk*. Bakteri patogen indikator yang digunakan adalah *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, dan *S. aureus* ATCC 25923. *E. coli* merupakan perwakilan dari bakteri Gram negatif, *S. aureus* merupakan perwakilan dari bakteri Gram positif, *B. subtilis* merupakan perwakilan dari bakteri Gram negatif yang membentuk endospora. Bakteri patogen indikator yang dikulturkan dalam medium NB diukur nilai absorbensinya hingga mencapai kisaran

0,08-0,13 pada panjang gelombang 625 nm yang merupakan *acceptable range* dari 0,5 McFarland Standards (6), selanjutnya dituang sebanyak 0,5 mL pada 20 mL medium NA dengan metode *pour plate*. Konsentrasi ekstrak kasar yang digunakan adalah 12,5; 25; 37,5; dan 50 mg/mL. Kontrol positif yang digunakan dalam pengujian ini adalah *Amoxicillin* dengan konsentrasi 50 g/mL, sedangkan etil asetat sebanyak 20 μ L digunakan sebagai kontrol negatif. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Aktivitas antibakteri ditentukan berdasarkan diameter zona penghambatan yang terbentuk disekitar *paper disk* yang telah diberi sampel uji.

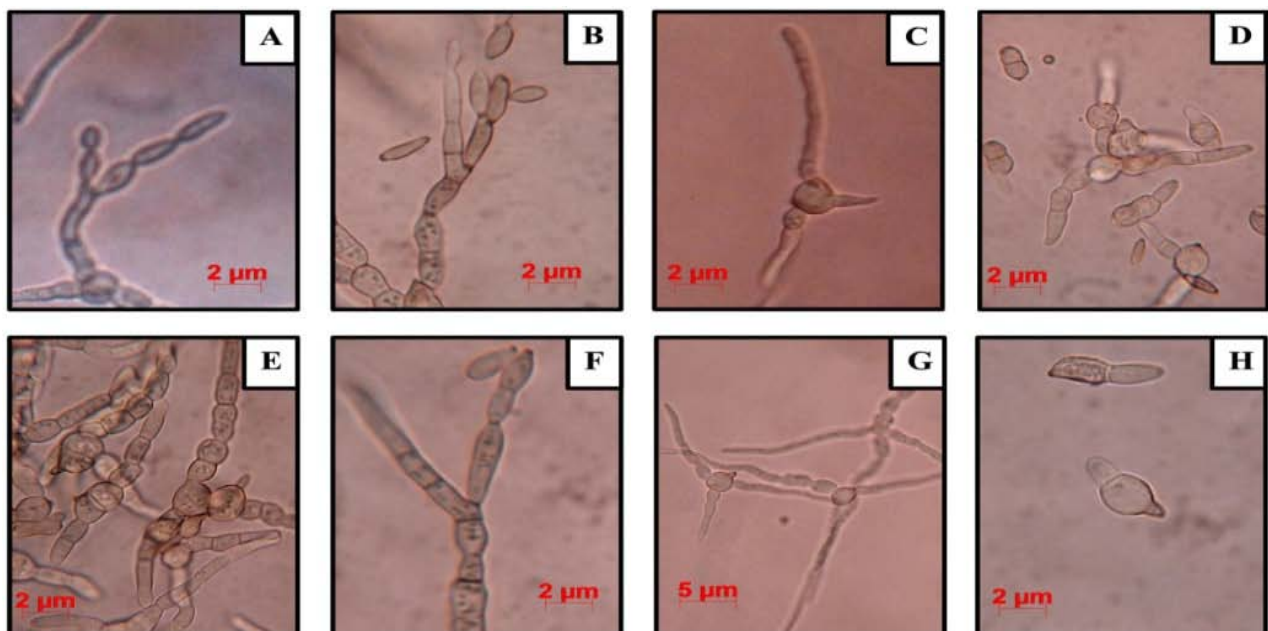
Uji Aktivitas Antimitotik

Bawang bombay (*Allium cepa*) direndam bagian pangkalnya dengan aquades selama 72 jam pada suhu 25°C, selanjutnya akar bawang bombay direndam dalam ekstrak dengan konsentrasi 20 dan 25% sebanyak 5 mL selama 24 jam. Aquades digunakan sebagai kontrol positif, sedang-

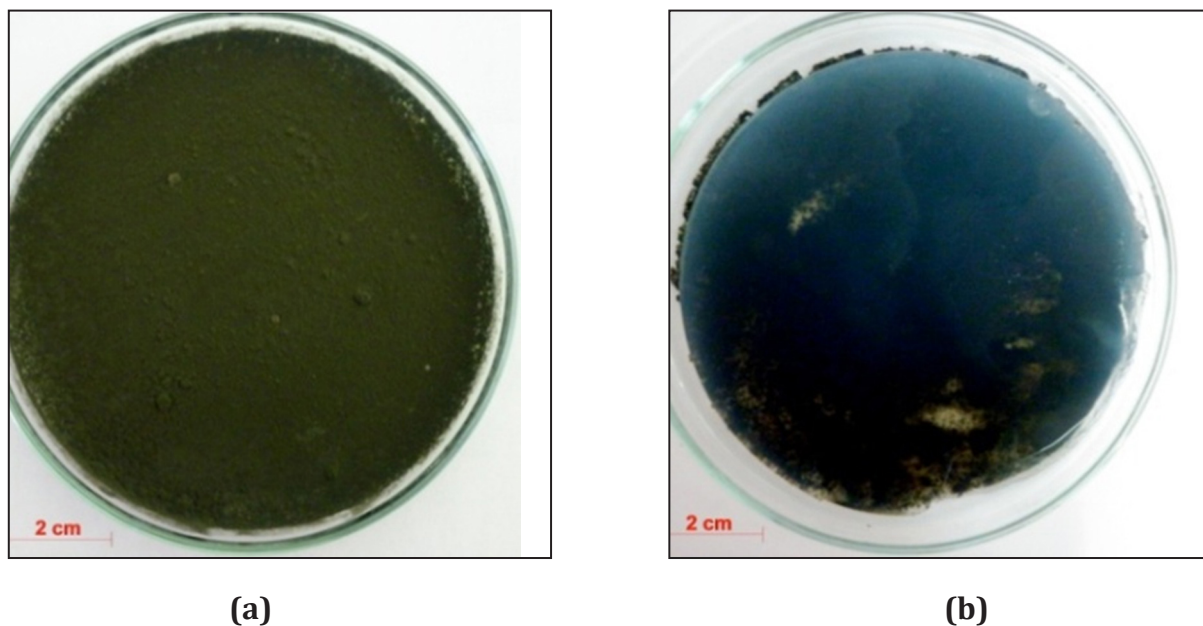
kan Tween 80, 0.05% digunakan sebagai kontrol negatif. Akar *A. cepa* dipotong sepanjang 1 mm, direndam dengan HCl 1M selama 2 menit, dibilas dengan aquades, diwarnai dengan asetokarmin selama 1 menit, difiksasi, dan diamati di bawah mikroskop. Uji aktivitas antimitotik dilakukan dengan dua kali pengulangan. Aktivitas antimitotik ditentukan berdasarkan nilai indeks mitosis yang dihitung dengan rumus: jumlah sel yang membelah/jumlah sel total.

Analisa Statistik

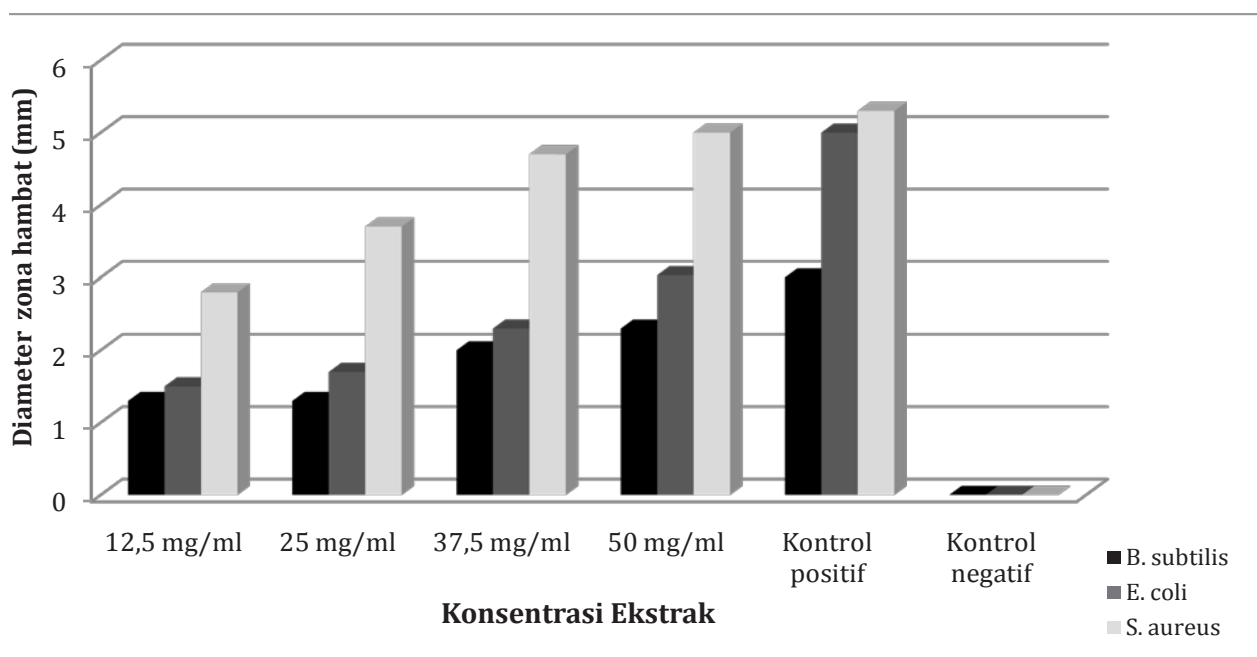
Analisa statistik yang digunakan adalah *Analysis of Variance* (ANOVA) *one way*. Uji ANOVA menggunakan program SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) 16.0 untuk Mac. Selanjutnya data diolah dengan *Post Hoc test* Tukey's HSD (*Honestly Significant Difference*). Data yang dianalisa secara statistik adalah pengaruh konsentrasi ekstrak terhadap aktivitas antibakteri dan antimitotik, dan pengaruh konsentrasi ekstrak terhadap abnormalitas sel-sel akar *A. cepa*.



Gambar 1. Fungi TID.24041021-2 secara mikroskopik (A, B, F: percabangan pada fungi yang diawali dengan septa), (C dan G: *intercalary chlamydoconidium* yang sedang mengalami *budding* dan sel pada bagian ujung memiliki ukuran lebih kecil dibandingkan sel lainnya), (D dan H: peristiwa *budding* pada spora), (E: *pseudohypha* yang membentuk rantai panjang dengan *intercalary chlamydoconidium* pada bagian tengah).



Gambar 2. Fungi TID.24041021-2 (a) Penampang bagian atas berwarna hijau (b) Penampang bagian bawah berwarna hitam.



Gambar 3. Grafik rerata diameter zona penghambatan pertumbuhan bakteri oleh ekstrak kasar etil asetat fungi TID.24041021-2

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Identifikasi Fungi

Fungi (TID.24041021-2) diisolasi dari sponge (TID. 24041021). Secara makroskopis memiliki ciri berwarna hijau pada permukaan bagian atas

dan berwarna hitam pada bagian bawah (gambar 2). Fungi secara mikroskopis (gambar 1) terlihat memiliki *pseudohypha* dimana bentuknya seperti rantai yang memanjang dan tersusun dari sel-sel yang bertambah panjang karena proses pertunasan (*budding*), memiliki percabangan yang

diawali dengan adanya septa. Sel yang terdapat pada bagian ujung (terminal) memiliki ukuran lebih kecil dibandingkan dengan sel lainnya. Fungi tersebut juga memiliki *intercalary chlamydoconidium* yang merupakan konidium berbentuk bulat

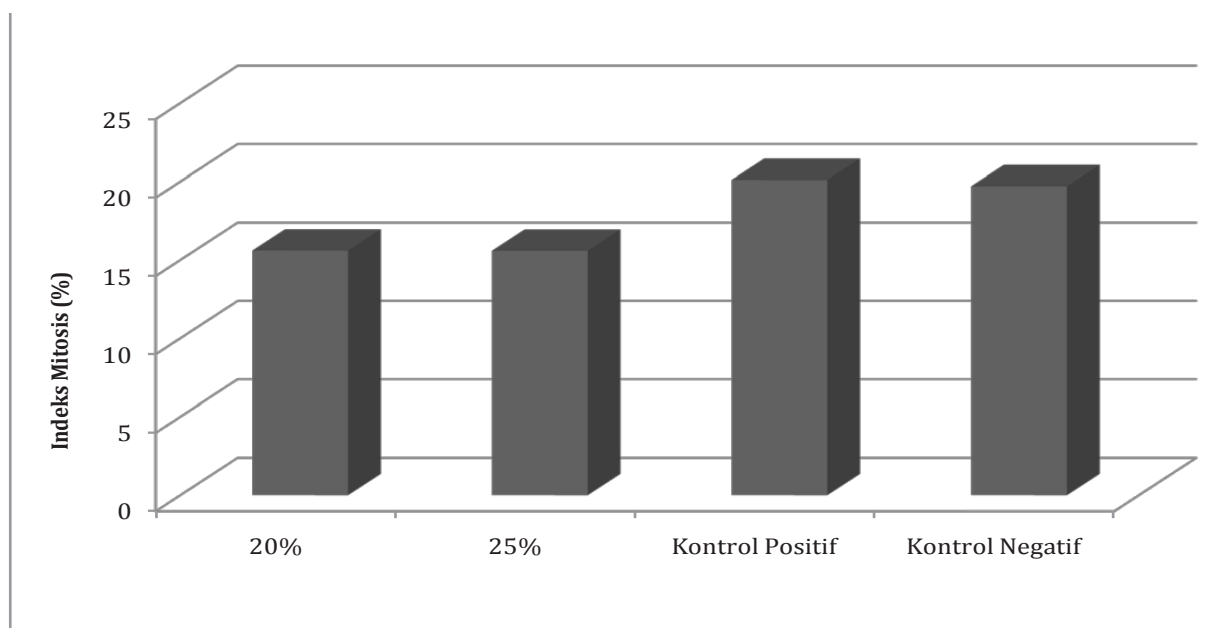
yang terletak di tengah-tengah hifa. Berdasarkan karakteristik tersebut, fungi (TID.24041021-2) memiliki kemiripan dengan *Wangiella* sp. (7) *Wangiella* sp. memiliki nama lain yaitu *Exophiala* (8).

Tabel 1. Rerata diameter zona penghambatan pertumbuhan bakteri oleh ekstrak kasar etil asetat fungi TID.24041021-2

Konsentrasi Sampel	Rerata diameter penghambatan (mm)		
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
12,5 mg/mL	1,30±0,58 ^b	1,50±0,50 ^{ab}	2,80±0,29 ^b
25 mg/mL	1,30±0,58 ^b	1,70±0,58 ^{abc}	3,70±0,58 ^{bc}
37,5 mg/mL	2,00±0,50 ^{bc}	2,30±0,58 ^{bc}	4,70±0,58 ^{cd}
50 mg/mL	2,30±0,58 ^{bc}	3,03±0,58 ^{cd}	5,00±1,00 ^{cd}
Kontrol Positif (<i>Amoxicillin</i> 50 µg/mL)	3,00±0,00 ^c	5,00±1,00 ^d	5,30±0,58 ^d
Kontrol Negatif (20 µl etil asetat)	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a

Keterangan: Hasil merupakan rerata dari tiga kali ulangan.

Notasi *superscript* yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata menurut uji Tukey's HSD pada p=0,05.



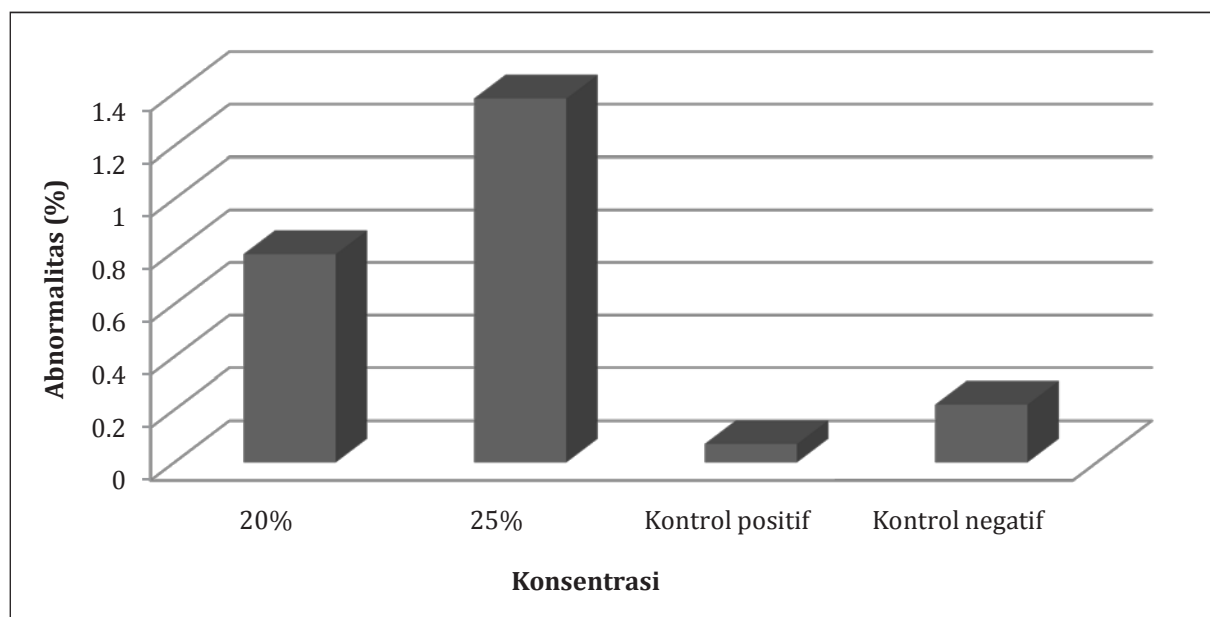
Gambar 4. Diagram batang rerata indeks mitosis ekstrak etil asetat fungi TID.24041021-2

Tabel 2. Rerata indeks mitosis ekstrak etil asetat fungi TID.24041021-2

Konsentrasi Sampel	Indeks Mitosis
20%	15,60±1,24 ^a
25%	15,59±0,68 ^a
Kontrol Positif (Aquades, 100%)	20,10±2,07 ^a
Kontrol Negatif (Tween 80, 0.05%)	19,70±8,34 ^a

Keterangan: Hasil merupakan rerata dari dua kali ulangan.

Notasi *superscript* yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata menurut uji Tukey's HSD pada p=0,05.



Gambar 5. Diagram batang rerata persentase abnormalitas ekstrak kasar etil asetat fungi TID.24041021-2

Tabel 3. Rerata persentase abnormalitas ekstrak kasar etil asetat fungi TID.24041021-2

Konsentrasi Ekstrak	Abnormalitas (%)
Ekstrak 20%	0,79±0,25 ^{ab}
Ekstrak 25%	1,38±0,42 ^b
Kontrol positif (Aquades 100%)	0,07±0,01 ^a
Kontrol negatif (Tween 80,0.05%)	0,22±0,17 ^a

Keterangan: Hasil merupakan rerata dari dua kali ulangan.

Notasi *superscript* yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata menurut uji Tukey's HSD pada $p=0,05$.

Uji Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan empat konsentrasi yaitu 12.5; 25; 37.5; dan 50 mg/mL. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar etil asetat dapat dilihat pada gambar 3 dan tabel 1. Pada tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak kasar etil asetat dengan konsentrasi 12,5 mg/mL mulai menunjukkan adanya aktifitas terhadap ketiga bakteri pathogen. Ekstrak kasar etil asetat dengan konsentrasi 50 mg/mL menunjukkan aktifitas antibakteri tertinggi terhadap *S. aureus* dengan diameter daerah hambat (DDH) 5 mm. Kontrol positif (*Amoxicillin*) dengan konsentrasi 50 µg/mL menunjukkan adanya aktifitas antibakteri tertinggi, dengan DDH terhadap *B. subtilis* (3 mm), *E. coli* (5 mm), dan *S. aureus* (5.30 mm). Diameter zona hambat bakteri dari ekstrak kasar

tidak dipengaruhi oleh pelarut etil asetat karena etil asetat dengan volume 20 µl tidak menunjukkan adanya zona hambat terhadap *B. subtilis*, *E. coli*, dan *S. aureus*. Adanya hambatan dari ekstrak kasar fungi terhadap pertumbuhan bakteri patogen karena adanya senyawa-senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak kasar fungi yang mempunyai sifat antimikroba. Fungi laut *Exophiala pisciphilla* bersimbiosis dengan spons *Mycale adhaerensm* menghasilkan senyawa antibakteri *Exophilin A*. (8)

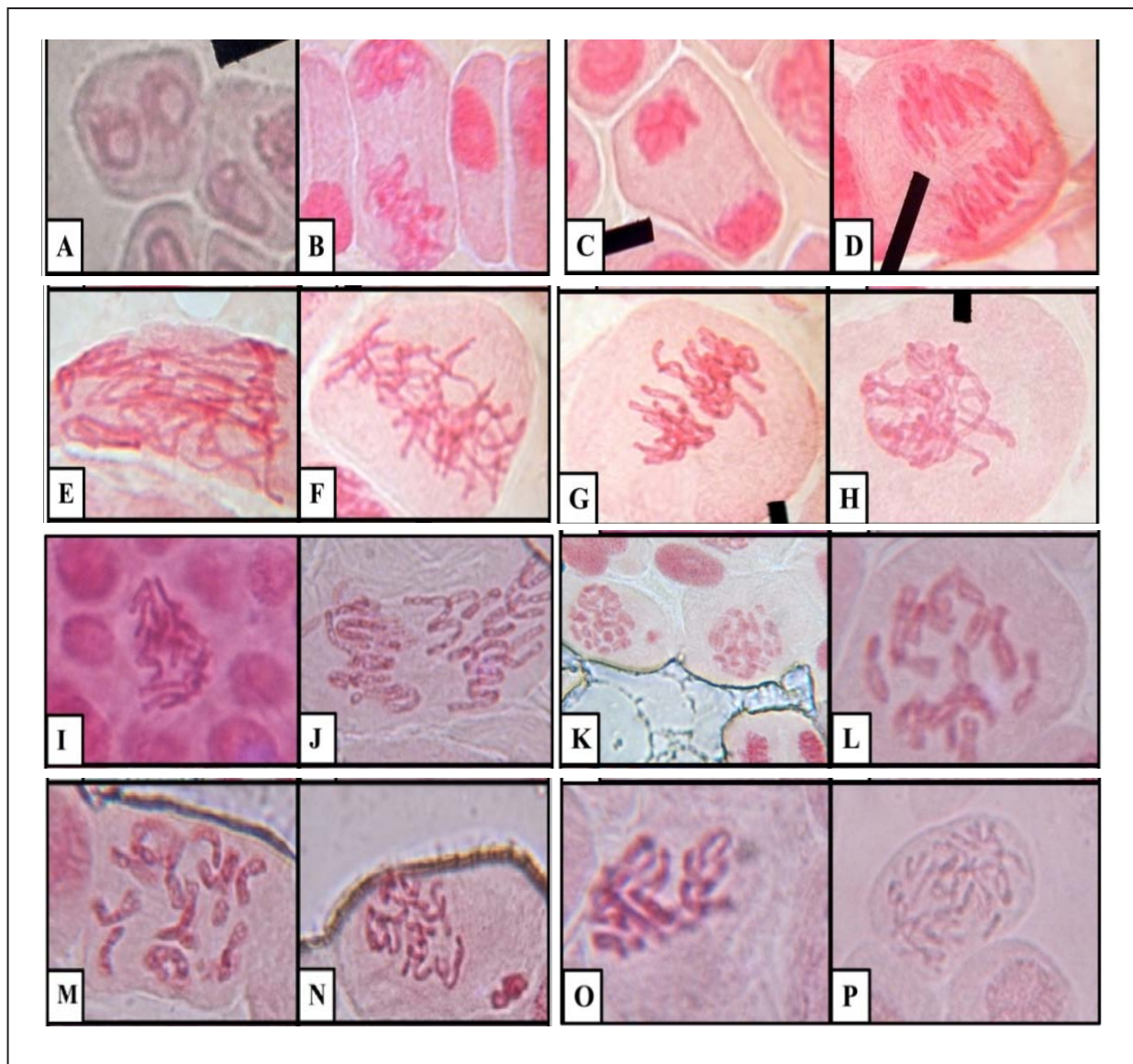
Uji Antimitotik

Uji aktivitas antimitotik dilakukan dengan melihat perbandingan sel-sel yang sedang bermitosis dengan jumlah sel secara keseluruhan (indeks mitosis). Sampel yang memiliki aktivitas

antimitotik menunjukkan hasil berupa nilai indeks mitosis yang lebih kecil dibandingkan dengan kontrol yang tidak diberi perlakuan. Hasil uji aktivitas antimitotik ekstrak kasar etil dengan konsentrasi 20% dan 25%, serta kontrol positif (aquades 100%) dan Kontrol negatif (Tween 80 0,05%) dapat dilihat pada gambar 4 dan tabel 2. Pada tabel 2 menunjukkan bahwa indeks mitosis dari akar *A. cepa* dengan konsentasi 20 dan 25 %

masing-masing sebesar 15. 60 dan 15.59 %. sedangkan kontrol positif dan negatif masing-masing sebesar 20.10 dan 19.70 %. Indeks mitosis ekstrak kasar etil asetat lebih kecil dibandingkan dengan indeks mitosis kontrol positif dan kontrol negatif. Indeks mitosis ekstrak kasar etil asetat serta kontrol positif dan kontrol negatif tidak menunjukkan beda nyata ($p>0,05$).

Ekstrak kasar etil asetat dapat menyebabkan



Gambar 6. Abnormalitas kromosom pada sel-sel akar *A. cepa*. (A, B, C) *Binucleate cell*: suatu abnormalitas dimana dalam satu sel terdapat dua inti sel. (D) *Multipolar*: abnormalitas yang terjadi saat *sister chromatid* tidak memiliki satu kutub pembelahan sehingga mikrotubul kinetokor tidak terbentuk. (E, F, G) *Spindle abnormalities*: abnormalitas yang terjadi karena benang spindel mengalami gangguan sehingga kromosom menjadi tidak teratur (H) *Vagrant chromosome*: abnormalitas dimana ada bagian dari kromosom yang tersebar. (I, K, L) *Chromosome pairing*: *Sister chromatid* tersebar dalam sel. (J, M, N, O, P) *Chromosome spreading*: kromosom yang belum berpasangan tersebar di dalam sel (9).

abnormalitas pada sel-sel akar *A. cepa*. Ekstrak kasar etil asetat fungi TID.24041021-2 konsentrasi 20% menunjukkan abnormalitas sebesar 0,79%, sedangkan konsentrasi 25% menunjukkan abnormalitas sebesar 1,38%. Peningkatan konsentrasi ekstrak dapat mengakibatkan peningkatan persentase abnormalitas pada sel-sel akar *A. cepa*. Kontrol positif ditemukan adanya abnormalitas sebesar 0,07 % sedangkan abnormalitas pada kontrol negatif sebesar 0,22% (gambar 5). Pada sel-sel akar *A. cepa* yang diberi perlakuan dengan ekstrak kasar etil asetat, abnormalitas yang ditemukan semakin banyak. Persentase abnormalitas yang ditunjukkan oleh ekstrak kasar etil asetat dengan konsentrasi 25% cukup tinggi dan memiliki beda nyata dengan kontrol negatif dan kontrol positif ($p < 0,05$). Kontrol positif dan kontrol negatif tidak memiliki beda nyata ($p < 0,05$) yang mengindikasikan bahwa Tween 80 0,05% tidak mempengaruhi persentase abnormalitas sel-sel akar *A. cepa* (tabel 3).

Jenis-jenis abnormalitas kromosom yang ditemukan cukup beragam, seperti *binucleate cell*, *spindle abnormalities*, *multipolar*, *vagrant chromosome*, *chromosome pairing*, dan *chromosome spreading* yang dapat dilihat pada gambar 6. Abnormalitas yang terjadi disebabkan karena adanya gangguan pada mikrotubul sehingga proses mitosis sel-sel *A. cepa* tidak berjalan dengan normal. *Binucleate cell* terjadi karena terhambat-

nya *cell plate formation* sehingga telofase tidak diikuti dengan sitokinesis yang mengakibatkan tidak terbentuknya dinding sel yang memisahkan dua sel yang sudah membelah. Abnormalitas lain yang terjadi merupakan hasil dari *colchicine mitosis* yang merupakan suatu proses inaktivasi dari spindle yang diikuti dengan tersebaranya kromosom secara acak di dalam sel (9).

KESIMPULAN DAN SARAN

Ekstrak kasar etil asetat fungi TID.24041021-2 memiliki aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis*, *E. coli*, dan *S. aureus*. Aktivitas antibakteri paling tinggi ditunjukkan terhadap *S. aureus*. Ekstrak kasar etil asetat mengakibatkan terjadinya penurunan indeks mitosis sel-sel akar *A. cepa* dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Fungi laut (strain TID.24041021-2) memiliki kemiripan dengan fungi genus *Wangiella* baik secara makroskopis maupun mikroskopis.

Perlu dilakukan fraksinasi dari ekstrak kasar etil asetat serta penentuan struktur dengan menggunakan 2D-NMR dari senyawa yang berperan sebagai anti bakteri dan antimitotik. Identifikasi isolat fungi TID.24041021-2 perlu dilakukan lebih lanjut sampai pada tahap spesies. Identifikasi ini dapat dilakukan secara molekuler dengan 18S rRNA.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lee YK, Lee JH, Lee, HK. Microbial Symbiosis in Marine Sponges. *Journal of Microbiology*. 2001;39 (4) : 254-264.
2. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Biology of Microorganisms, Twelfth Edition. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings. 2009.
3. Namikoshi M, Suzuki S, Meguro S, Kobayashi H, Mine Y, Kasuga I. Inhibitors of Microtubule Assembly Produced by the Marine Fungus Strain TUF 98F139 Collected in Palau. *Journal of Tokyo University of Fisheries*. 2002; 88:1-6
4. Roberge M, Cinel B, Anderson HJ, Lim L, Jiang X, Xu L, Bigg CM, Kelly MT, Andersen RJ.. Cell-based Screen for Antimitotic Agents and Identification of Analogues of Rhizoxin, Eleutherobin, and Paclitaxel in Natural Extracts. *American Association for Cancer Research*. 2000; 60: 5052-5058.
5. Leslie BJ, Holaday RH, Nguyen T, Hergenrother PJ. Phenylcinnamides as Novel Antimitotic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010; 53: 3964-3972.
6. Andrews JM. BSAC Standardized Disc Susceptibility Testing Method (version 8). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; 64:454-489.

7. Larone DH. Medically Important Fungi: A Guide to Identification 4th Edition. Washington: ASM Press. 2002.
8. Doshida J, Hasegawa H, Onuki H, Shimidzu N. Exophilin A, A New Antibiotic From A Marine Micro-organism *Exophiala pisciphila*. *Journal of Antibiotics* 1996; 49(11):1105-1109.
9. Auti S, Pagare R, Ahire D, Sawale V. Cytogenetical Studies on The Effect of Omnacortil on Root Tip Cells of *Allium cepa* L. *Journal of Cell and Tissue Research*. 2010;10(03):2331-2335.

Kajian Biodegradasi Film Plastik Campuran Polimer Sintetik dengan Biopolimer dalam Larutan Air

Melzi Octaviani¹, Erizal Zaini¹, Akmal Djamaan²

ABSTRACT: The degradation of a plastic film containing polymer synthetic polystyrene (PS) and biopolymer poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerat) [P(3HB-co-3HV)] in various composition in aqueous solution by in-vitro and in-vivo has been carried out. The testing was conducted based on immersion test in aquadest, river water, pH 4 solution, 6, 8 and 10. Rate degradation measured use linear regression equality and parameter is time degradation 50% (t 50%), time degradation 95% (t 95%) and indicated by the slope (k). The results showed that, degradation of a plastic film containing PS and P(3HB) in pH 6 solution occurred faster, followed by ratio PS/ P(3HB) 95:5, PS/ P(3HB) 90:10, PS/ P(3HB) 85:15 and PS/ P(3HB) 80:20, in contrast degradation of pure PS (100:0) not occurred. It is also observed that the biodegradation plastic film containing PS/P(3HB-co-3HV) in river water ratio PS/P(3HB-co-3HV) 95:5, PS/P(3HB-co-3HV) 90:10 and PS/P(3HB-co-3HV) 85:15, in contrast degradation of pure PS (100:0) not occurred.

Keywords: biodegradation, polystyrene, poly(3-hydroxybutyrate), poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerat), plastic film.

ABSTRAK: Telah dilakukan uji penguraian film plastik campuran polimer sintetik polistiren (PS) dengan biopolimer poli(3-hidroksibutirat) [P(3HB)] dan poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) [P(3HB-ko-3HV)] dengan berbagai perbandingan dalam larutan air secara in-vitro dan in-vivo. Pengujian dilakukan dengan metode immersion test dalam air suling, air sungai, larutan pH 4, 6, 8 dan 10. Laju penguraiannya dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear dengan parameter meliputi: waktu penguraian 50% b/b (t 50%), waktu penguraian 95% b/b (t 95%) dan konstanta laju penguraian (k). Penguraian film plastik terjadi paling cepat dalam larutan pH 6 dengan perbandingan PS/P(3HB) 95:5, diikuti oleh PS/P(3HB) 90:10, diikuti oleh PS/P(3HB) 85:15 dan PS/P(3HB) 80:20, sedangkan film plastik PS murni (100:0) tidak mengalami penguraian. Begitu juga hasil penguraian film plastik campuran PS/P(3HB-ko-3HV) paling cepat terjadi dalam air sungai dengan perbandingan PS/P(3HB-ko-3HV) 95:5 diikuti oleh PS/P(3HB-ko-3HV) 90:10 dan PS/P(3HB-ko-3HV) 85:15, sedangkan film plastik PS murni (100:0) tidak mengalami penguraian.

Kata kunci: biodegradasi, polistiren, poli(3-hidroksibutirat), poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat), film plastik.

¹ Fakultas Farmasi Universitas Andalas, Padang

² Laboratorium Bioteknologi Biota Sumatera, Universitas Andalas, Padang

Korespondensi:

Akmal Djamaan

Email : akmaldjamaan@gmail.com

PENDAHULUAN

Plastik merupakan bahan polimer sintetik yang banyak digunakan dalam kehidupan manusia. Hampir setiap produk menggunakan plastik sebagai kemasan atau bahan dasar karena plastik mempunyai keunggulan seperti ringan tetapi kuat, transparan, tahan air serta harganya relatif murah dan terjangkau oleh semua kalangan masyarakat (1). Setiap tahun sekitar 100 juta ton plastik kemasan sintetik diproduksi dunia untuk digunakan di berbagai sektor industri, makanan, minuman, farmasi dan furnitur dan sebagainya dan kira-kira sebesar itulah sampah plastik yang dihasilkannya (2).

Pemakaian plastik yang dapat diuraikan (biodegradable plastic) atau ramah lingkungan adalah salah satu jalan keluarnya. Plastik ini dapat diperoleh melalui biosintesa secara fermentasi menggunakan mikroorganisme penghasil poli(3-hidroksialkanoat), P(3HA). Sampai saat ini telah diketahui lebih dari 300 jenis mikroorganisme yang dapat menghasilkan P(3HA) di dalam selnya. Di antara P(3HA), polimer poli(3-hidroksibutirat) [P(3HB)] dan poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) [P(3HB-ko-3HV)] adalah yang paling banyak diteliti, karena P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) mempunyai sifat mudah terurai dalam jangka waktu tertentu bila dibuang ke lingkungan (2,3).

Penggunaan biopolimer P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) secara luas masih terbatas, hal ini disebabkan P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) memiliki sifat mudah pecah dan rapuh sehingga menjadi kendala dalam penggunaannya secara konvensional untuk menggantikan plastik sintetik (2). Untuk mengatasi permasalahan ini telah dilakukan penelitian secara luas untuk memperbaiki sifat fisika P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV). Salah satu cara yang dilakukan adalah dengan membuat bentuk campuran P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) dengan polimer sintetik lain, untuk mendapatkan filem plastik yang kuat dan elastis tetapi terurai di lingkungan.

Polistiren (PS) merupakan salah satu jenis po-

limer yang banyak digunakan bersifat kaku, keras, berwarna putih dan sulit terbiodegradasi oleh mikroorganisme (nonbiodegradable). Polistiren foam dikenal luas dengan istilah styrofoam, banyak digunakan sebagai bahan tempat makan, tempat minum sekali pakai, bahan pelindung dan penahan getaran barang yang fragile, seperti elektronik. Kemasan plastik jenis polistiren sering menimbulkan masalah pada lingkungan karena bahan ini sulit mengalami biodegradasi dan sulit didaur ulang (4).

Uji penguraian filem plastik campuran polistiren dengan P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) dalam larutan berair pada berbagai pH dilakukan agar dapat diketahui pH yang cocok untuk penguraian filem plastik. Tujuan ini dapat diaplikasikan untuk mengatasi masalah pencemaran lingkungan yang disebabkan oleh sampah-sampah plastik yang tidak dapat terurai di lingkungan. Dengan demikian limbah-limbah plastik nantinya dapat dimusnahkan dalam lingkungan pH yang sesuai untuk penguraiannya. Penguraian yang terjadi ditentukan dengan menghitung persentase kehilangan berat dari filem plastik yang diuji dalam selang interval waktu tertentu.

METODE PENELITIAN

Sampel

Sampel P(3HB) telah diperoleh dalam bentuk serbuk P(3HB) yang dihasilkan dari *Erwinia sp.* USMI-20. Sampel P(3HB-ko-3HV) telah diperoleh dalam bentuk serbuk P(3HB-ko-3HV) yang dihasilkan dari *Erwinia sp.* USMI-20 menggunakan sumber karbon dari minyak kelapa sawit dan n-pentanol untuk menghasilkan P(3HB-ko-3HV) dalam bioreaktor berkapasitas 10L telah dimurnikan oleh peneliti sebelumnya (5). Polistiren (PS) diperoleh dari bahan styrofoam yang banyak digunakan sebagai bahan pelindung dan penahan getar barang elektronik dengan kode PS-6 sesuai dengan aturan kemasan plastik. Polistiren dan biopolimer ditimbang, dilanjutkan dengan pembuatan filem plastik dari

masing-masing perbandingan. PS dimasukkan ke dalam gelas piala kemudian ditambahkan 10 mL kloroform dan dipanaskan di atas *hot plate* sampai larut dan mendidih. Setelah itu, ditambahkan P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) ke dalam gelas piala yang sama dan diaduk sampai homogen. Selanjutnya, dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan kering pada suhu ruang sehingga diperoleh film plastik. Film plastik yang terbentuk ditimbang beratnya. Plastik yang diperoleh dari setiap cawan petri dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm untuk campuran polistiren dengan P(3HB) dan ukuran 1,5 x 1,5 cm untuk campuran polistiren dan P(3HB-ko-3HV) serta ditimbang berat masing-masing potongan plastik tersebut. Potongan plastik ini merupakan sampel yang akan diuji penguraian. Untuk setiap pengujian pada setiap perbandingan dilakukan dua kali pengulangan (duplo).

Media

Air suling, air sungai, larutan pH 4, larutan pH 6, larutan pH 8 dan larutan pH 10, komposisi sesuai dengan Farmakope Indonesia (6).

Kondisi percobaan

Pengujian dilakukan dengan metode pencelupan sampel dalam larutan uji (immersion test) (7). Air suling, larutan pH 4, larutan pH 6, larutan pH 8, dan larutan pH 10 dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 ml, masing-masing sebanyak 100 ml. Dibuat pembungkus segi empat dari kain kasa dengan ukuran 2 x 2 cm sebagai tempat sampel uji untuk meletakkan sampel pada masing-masing media. Pada masing-masing pembungkus dimasukkan 1 lembar sampel pada tiap media dan diberi label. Selanjutnya pembungkus yang berisi sampel dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan diletakkan di atas alat Rotary Shaker Incubator dengan kecepatan goncangan 120 rpm selama 1 minggu.

Penentuan kecepatan penguraian film plastik secara in-vivo dalam air sungai sesuai dengan metode standar yang direkomendasi oleh American Society for Testing and Materials (ASTM)

(10). Parameter penguraian yang diamati adalah pengurangan berat dari plastik yang diuji setelah pencelupan (Water Immersion Test) dalam air sungai dalam jangka waktu tertentu (8,9).

Masing-masing sampel, dimasukkan ke dalam nampan plastik yang mempunyai panjang 34 cm, lebar 28 cm, dan kedalamannya 13 cm. Uji penguraian pada air sungai dilakukan dengan metode uji pencelupan: plastik film dengan ukuran 1,5 x 1,5 cm dari masing-masing perbandingan dice-lupkan ke dalam air sungai. Setelah periode waktu tertentu sampel diangkat dari tempat perlakuan, dibersihkan dengan air suling dan dikeringkan sampai berat konstan, kemudian ditimbang berat film plastik yang tersisa. Periode waktu pengambilan film plastik adalah minggu pertama, kedua, ketiga, keempat dan kelima.

Penentuan Parameter Fisik Film Plastik

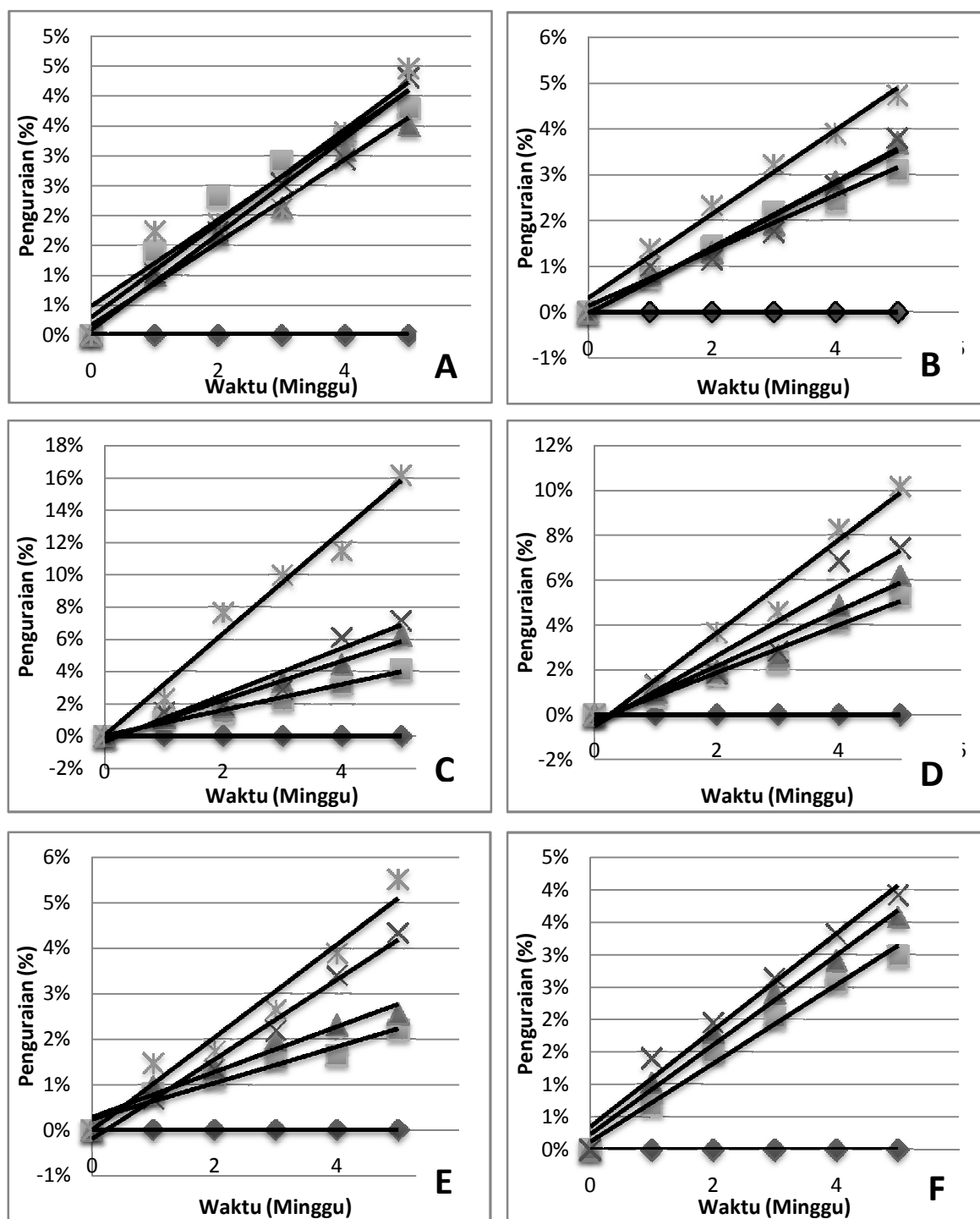
Pegujian titik leleh dengan alat Melting Point Apparatus dan pengujian kuat tarik dengan alat pengukur tensile strength.

Analisis Data

Dari data yang diperoleh dibuat profil penguraian pada selang waktu pengambilan sampel (minggu) terhadap persen penguraian plastik dari masing-masing media. Dilihat pengaruh dari pencampuran polistiren dengan P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) terhadap lamanya penguraian pada berbagai media yang digunakan dibandingkan dengan film polistiren murni. Dihitung laju penguraian dengan menggunakan persamaan regresi linear dan parameternya yang meliputi waktu penguraian 50% ($t_{50\%}$) dan waktu penguraian mendekati 100% ($t_{95\%}$) dari film plastik campuran polistiren dengan P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) dibandingkan dengan polistiren murni.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Film plastik yang dihasilkan dalam penelitian ini merupakan film plastik campuran plastik sintetik (polistiren) dengan biopolimer P(3HB)



Keterangan : ♦ = 100:0 ■ = 95:5 ▲ = 90:10 × = 85:15 ✖ = 80:20

Gambar 1. Profil laju penguraian film plastik campuran plastik sintetis dan biopolimer pada berbagai perbandingan dalam berbagai media pengujian (A) PS dan P(3HB) dalam air suling (B) PS dan P(3HB) dalam larutan pH 4 (C) PS dan P(3HB) dalam larutan pH 6 (D) PS dan P(3HB) dalam larutan pH 8 (E) PS dan P(3HB) dalam larutan pH 10 (F) PS dan P(3HB-ko-3HV) dalam air sungai.

dan P(3HB-ko-3HV) dengan berbagai perbandingan. Film plastik ini dibuat dengan teknik blending yang diikuti dengan penguapan pelarut (*Solven Casting*). Dari film plastik yang dihasilkan

akan dilakukan pengujian sifat fisiknya melalui pengujian titik leleh dan kuat tarik. Pengujian titik leleh film plastik campuran PS dan P(3HB) dengan perbandingan 100:0, 95:5, 90:10, 85:15

dan 80:20 secara berturut-turut adalah 200°C – 210°C, 195°C – 205°C, 185°C – 195°C, 180°C – 190°C, dan 178°C – 188°C. Sementara itu, pengujian terhadap kuat tarik (tensile strength) film plastik campuran PS dan P(3HB) dengan per-

bandingan 100:0, 95:5, 90:10, 85:15 dan 80:20 secara berturut-turut adalah 40 MPa, 35,9 MPa, 27,5 MPa, 22,10 MPa dan 13,86 MPa. Dari data ini terlihat bahwa film plastik yang dihasilkan, secara fisik berupa lembaran yang kokoh, dan tidak

Tabel 1. Perbandingan konstanta laju penguraian, waktu penguraian 50% dan waktu penguraian 95% film plastik campuran PS dengan P(3HB) pada berbagai media pengujian

No.	Parameter Penguraian	Larutan Uji				
		Air suling	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10
1	PS murni					
	k (%/minggu)	-	-	-	-	-
	t 50 % (minggu)	-	-	-	-	-
	t 95 % (minggu)	-	-	-	-	-
2	PS dan P(3HB) 95:5					
	k (%/minggu)	0,72	0,61	0,79	1,06	0,40
	t 50 % (minggu)	68,73	82,21	63,06	47,30	124,95
	t 95 % (minggu)	131,18	156,40	119,84	89,65	237,93
3	PS dan P(3HB) 90:10					
	k (%/minggu)	0,70	0,72	1,22	1,24	0,50
	t 50 % (minggu)	71,93	69,60	41,25	40,70	99,97
	t 95 % (minggu)	136,88	132,21	78,21	77,10	190,44
4	PS dan P(3HB) 85:15					
	k (%/minggu)	0,80	0,71	1,45	1,56	0,88
	t 50 % (minggu)	62,20	70,36	34,80	32,31	57,31
	t 95 % (minggu)	118,27	133,64	65,89	61,09	108,68
5	PS dan P(3HB) 80:20					
	k (%/minggu)	0,79	0,92	3,16	2,08	1,02
	t 50 % (minggu)	63,26	54,14	15,81	24,28	49,05
	t 95 % (minggu)	120,53	103,16	30,05	45,91	93,18

Tabel 2. Perbandingan konstanta laju penguraian, waktu penguraian 50% dan waktu penguraian 95% film plastik campuran PS dengan P(3HB-ko-3HV) pada berbagai media air sungai

No.	Parameter Pengujian	Larutan Uji
		Air sungai
1	PS murni	
	k (%/minggu)	-
	t 50 % (minggu)	-
	t 95 % (minggu)	-
2	PS dan P(3HB-ko-3HV) 95:5	
	k (%/minggu)	0,60
	t 50 % (minggu)	82,63
	t 95 % (minggu)	157,17
3	PS dan P(3HB-ko-3HV) 90:10	
	k (%/minggu)	0,69
	t 50 % (minggu)	72,16
	t 95 % (minggu)	137,40
4	PS dan P(3HB-ko-3HV) 85:15	
	k (%/minggu)	0,74
	t 50 % (minggu)	66,79
	t 95 % (minggu)	127,32

lentur. Dengan demikian bila akan diaplikasikan, sebaiknya filem plastik ini sebagai wadah kemasan, berupa gelas, botol, ember atau nampan plastik yang secara fisik memerlukan filem yang kuat dan kokoh.

Uji penguraian filem plastik campuran PS dengan P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) dilakukan secara in-vitro dan in-vivo, untuk melihat sejauh mana pengaruh penambahan P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) terhadap kecepatan penguraian filem plastik. Pada percobaan ini, uji penguraian dilakukan pada media yang berbeda, yaitu: air suling, air sungai, larutan pH 4, pH 6, pH 8, dan pH 10. Media ini dipilih untuk melihat pengaruh pH larutan yang berbeda-beda terhadap kecepatan penguraian dari filem plastik campuran PS dengan P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV). Dari pengujian ini dapat ditentukan konstanta laju penguraian, waktu penguraian 50% ($t_{50\%}$) dan waktu penguraian 95% ($t_{95\%}$) dari masing-masing filem plastik campuran PS dengan P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) yang diujikan dalam media yang berbeda. Profil laju penguraian filem plastik dalam media air suling, air sungai, larutan pH 4, pH 6, pH 8, dan pH 10 dapat dilihat pada Gambar 1.

Dari gambar tersebut terlihat bahwa berdasarkan waktu penguraian 50 % ($t_{50\%}$) dan waktu penguraian mendekati penguraian total ($t_{95\%}$) dari sampel dengan perbandingan yang sama dalam media pengujian yang berbeda akan memberikan nilai yang berbeda pula. Pada setiap perbandingan dari filem plastik campuran PS dan P(3HB) dalam media uji larutan pH 6 lebih cepat mencapai waktu penguraiannya dibandingkan media pengujian lainnya. Sementara itu, pada perbandingan PS dan P(3HB) yang digunakan, menunjukkan bahwa pada perbandingan 80:20 akan lebih cepat mencapai waktu penguraian 50% ($t_{50\%}$) dibandingkan dengan perbandingan lainnya, dimana perbandingan 80:20 < 85:15 < 90:10 < 95:5. Hal ini disebabkan karena pada perbandingan 80:20 mengandung komponen biopolimer P(3HB) yang paling banyak dari filem plastik lain. Sebaliknya pada polistiren murni tidak terjadi penguraian.

Data lengkap perbandingan konstanta laju penguraian (k), waktu penguraian 50 % ($t_{50\%}$) dan waktu penguraian 95 % ($t_{95\%}$) pada berbagai media pengujian ditunjukkan pada tabel 1 dan Tabel 2.

Waktu penguraian filem plastik campuran PS dan P(3HB-ko-3HV) dalam air sungai terjadi paling cepat pada perbandingan 85:15 yaitu dengan laju penguraian 0,74 %/minggu, waktu penguraian 50 % ($t_{50\%}$) adalah 66,79 minggu dan waktu penguraian 95 % ($t_{95\%}$) adalah 127,32 minggu, sedangkan polistiren murni tidak terjadi penguraian.

Pada perbandingan biopolimer yang lebih besar (80:20 dan 85:15) dalam campuran filem plastik di dalam berbagai media uji akan mengalami penguraian $t_{50\%}$ dan $t_{95\%}$ yang lebih cepat dibandingkan dengan perbandingan lainnya. Hal ini disebabkan karena mengandung komponen biopolimer P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) yang paling banyak dibandingkan dengan perbandingan lain. P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) merupakan biopolimer yang mengalami penguraian seratus persen apabila dibuang ke lingkungan (10), sehingga dengan adanya komponen tersebut dalam filem plastik yang diuji akan menyebabkan penguraian yang lebih cepat, dibandingkan dengan polistiren murni.

Kecepatan penguraian filem plastik juga dapat diketahui dari pengujian angka lempeng total, sehingga dapat diketahui jumlah koloni bakteri yang terdapat di dalam media uji air sungai. Diketahui bahwa semakin banyak populasi bakteri di dalam media uji, maka akan semakin cepat penguraian terjadi. Pada penelitian ini jumlah populasi mikroba dalam air sungai sebanyak $1,29 \times 10^4$ koloni/g. Data kerapatan populasi bakteri ini mempunyai korelasi positif dengan terjadinya pengurangan berat dari sampel filem plastik yang diuji (8,11).

Secara keseluruhan, penelitian ini dapat memberikan data tambahan untuk penggunaan filem plastik campuran plastik sintetik dan biopolimer untuk dapat dikembangkan lebih lanjut dalam berbagai material kemasan ramah lingkungan.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini ditunjukkan bahwa jumlah komponen P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) berpengaruh terhadap kecepatan penguraian film plastik campuran plastik sintetik dan biopolimer. Bertambah besar perbandingan P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) dalam film plastik, maka penguraiannya semakin cepat. Perbandingan antara polistiren dan P(3HB) yang paling cepat meng-

alami penguraian adalah perbandingan 80:20, sedangkan perbandingan antara polistiren dan P(3HB-ko-3HV) yang paling cepat mengalami penguraian adalah perbandingan 85:15. Penguraian film plastik campuran PS dengan P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) dalam media uji larutan pH 6 mengalami penguraian lebih cepat dibandingkan dengan media uji lainnya yaitu larutan air suling, air sungai, larutan pH 4, pH 8 dan pH 10.

DAFTAR PUSTAKA

1. Darni Y, Chici A, Ismiyati SD. Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II: Sintesa bioplastik dari pati pisang dan gelatin dengan plasticizer gliserol. Lampung: Universitas Lampung; 2008.
2. Djamaan A. Konsep Produksi Biopolimer P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) secara Fermentasi. Padang: Andalas University Press; 2011.
3. Majid MIA, Hori K, Aklyama M, Doi Y. Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Plant Oil by *Alcaligenes* sp. *Biodegradable Plastics and Polymers*. Elsevier Science B. V Amsterdam; 1994: 417-424.
4. BPOMRI. Kemasan Polistirena Foam (Styrofoam). Info POM, 9, 5: ISSN; 2008: 1829-9334.
5. Djamaan A. Penghasilan dan Pencirian P(3HB) dan P(3HB-ko-3HV) dari berbagai sumber karbon oleh *Erwinia* sp USMI-20. [Tesis S-3]. Penang: Universiti Sains Malaysia; 2004.
6. Depkes RI. Farmakope Indonesia. (Edisi IV). Jakarta: Depkes RI; 1995.
7. Swift G. Expectation for biodegradation testing methods. *Biodegradable Plastics and Polymers* (Eds. Doi Y and Fukuda K.). Elsevier Journal of Science. B. V. Amsterdam; 1994: 228-249.
8. Sawada H. *Biodegradable Plastic and Polymer: Field Testing of Biodegradable Plastics*; 1994: 298-312.
9. Djamaan A, Azizan MN, Majid MIA. Biodegradation of Microbial Polyesters P(3HB) and P(3HB-co-3HV) under The Tropical Climate Environment. *Int. J. Polym. Degrad. Stab* 2003; 80: 513-518.
10. Madjid MIA, Djamaan A, Few LL, Agustien A, Toh MS, Samian MR, Najimudin N, Azizan MN. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) and its Copolymer Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Erwinia* sp. USMI-20. *Int. J. Macromol* 1999; 25: 1-10.
11. Wool RP. Perspectives on Standard Test Methods for Biodegradable Plastic. *Biodegradable Plastics and Polymers* (Eds. Doi. Y and Fukuda. K.). Elsevier Journal of Science. B.V. Amsterdam; 1994.

Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Aka Lambuang

Yohannes Alen, Rustini, dan Resta Honesty

ABSTRACT: Antibacterial activity tests were conducted on the leaf fraction of Aka Lambuang (*Merremia peltata* (L.) Merr.) by dilution method and microplate reader towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results showed that activity performed at the minimum inhibitory concentration of 500 ppm and 1000 ppm respectively.

Keywords: *Merremia peltata*, antibacterial, microplate reader.

ABSTRAK: Telah dilakukan uji aktifitas antibakteri fraksi daun Aka Lambuang (*Merremia peltata* (L.) Merr.) dengan metoda dilusi dan microplate reader terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Hasilnya menunjukkan bahwa aktifitas terjadi pada konsentrasi hambat minimum berturut-turut: 500 ppm dan 1000 ppm.

Kata kunci: *Merremia peltata*, antibakteri, microplate reader.

Fakultas Farmasi Universitas Andalas,
Padang

Korespondensi:

Yohannes Alen

Email : yohannesallen@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Salah satu tanaman Indonesia yang memiliki potensi dalam bidang farmasi yang cukup menjanjikan adalah *Merremia peltata* (L.) Merr, atau dalam bahasa daerah (Minang) disebut Aka Lambuang merupakan family Convolvulaceae. Tumbuhan ini hidup di dataran rendah hutan hujan primer. Penyebaran di Indonesia meliputi Pulau Sumatera, Jawa, Sulawesi, Kalimantan dan Maluku (1, 2).

Secara tradisional, daun *Merremia peltata* (L.) Merr, telah digunakan oleh masyarakat Maluku Utara sebagai antikanker khususnya kanker payudara dengan cara meminum air rebusannya. Daun ini juga digunakan untuk pengobatan luka dan bengkak, terutama pada nodus limfatis dengan cara menempelkan daun yang sudah dihaluskan pada permukaan kulit yang sakit. Di samping itu, getah dari batang tumbuhan ini juga dapat digunakan untuk mengobati sesak nafas dan gejala asma. Di Vanuatu daun dari tumbuhan ini digunakan untuk membantu proses kelahiran dengan cara mencampurkan daun *Merremia peltata* dan *Merremia odorata*, yang kemudian diminum jusnya (3). Di Sumatera Barat daun *Merremia peltata* (L.) Merr, digunakan sebagai obat diare, sakit perut, batuk, sakit mata, luka, radang dan mengompres luka (4). Lebih lanjut Ruslin dan Sahidin melalui kajian etnobotaninya, bahwa Suku Tolaki di Sulawesi Tenggara memanfaatkan tumbuhan ini untuk mengobati ketombe dan penyakit kulit. Sedangkan khusus bagian akarnya digunakan untuk pengobatan kencing nanah, rajasinga, pembersih darah dan keputihan. Selain itu daunnya untuk mengobati bisul, anti-emetik, bengkak dan rheumatic (5).

Hasil uji skrining fitokimia daun segar, diketahui bahwa tumbuhan ini memiliki kandungan metabolit sekunder berupa terpenoid, steroid, saponin dan fenolik (6). Uji pendahuluan pada ekstrak dan fraksi secara in vitro dengan menggunakan plat KLT yang disemprot dengan reagen DPPH (2,2-diphenil-1-picrylhidrazil) menunjukkan bahwa tanaman ini memiliki aktivitas anti-

oksidan (7).

Selain itu juga sudah dilakukan pengujian efek antikanker dari ekstrak etanol daun *Merremia peltata* (L.) Merr, secara in vivo pada mencit putih jantan dengan metode *Micronucleus Assay*. Hasil menunjukkan terjadinya penurunan jumlah sel mikronuklei hewan percobaan dibandingkan jumlah sel mikronuklei kelompok hewan yang hanya diberi siklofosfamida (kelompok kontrol positif) secara bermakna (8).

Dari penggunaan tradisional tumbuhan ini sebagai obat diare, sakit perut dan luka yang disebabkan oleh bakteri. Maka, pada penelitian ini dilakukan pengujian efek antibakteri, dari fraksi daun *Merremia peltata* (L.) Merr, secara in vitro dengan metode dilusi. Sehingga dari penelitian ini diharapkan akan didapat hasil yang mendukung penggunaan tumbuhan ini secara tradisional oleh masyarakat sebagai antibakteri.

Dalam pengujian aktivitas antibakteri digunakan metoda dilusi. Dimana prinsip kerja dari metoda dilusi adalah mengamati kekeruhan suspensi mikroba uji dengan larutan standar pada konsentrasi tertentu yang memberikan penghambatan yang sama pada pengenceran bertingkat, sehingga diperoleh konsentrasi setengah dari konsentrasi awal (9).

METODE PENELITIAN

Alat

Seperangkat alat destilasi, corong pisah, corong, seperangkat peralatan rotary evaporator, penangas air, pipet tetes, gelas ukur, erlenmeyer berbagai ukuran, spatel, perkamen, pisau, timbangan analitik, vial, botol maserasi, kertas saring, plat KLT, pipa kapiler, lampu UV, tabung reaksi dan rak, batang pengaduk, pipet mikro (Biokit proline®), jarum ose, kapas, kain kasa, benang, lampu spiritus, vortex (Whirlinmixer TM), hotplate (EIC®), microtiterplate 96-well, lemari aseptis, autoklaf (All American®) model 25x, inkubator (Gallenkamp Plus®), Laminar Air Flow (LAF), microplate reader (Bio-Rad®) dan spektrofotometer UV-Vis.

Bahan

Daun *Merremia peltata* (L.) Merr., metanol, aquadest, heksan, etil asetat, larutan FeCl₃, vanillin asam sulfat, reagen Mayer, kloroform, kloroform ammonia, pasir bersih, H₂SO₄ 2N, asam asetat anhidrat, etanol, HCl pekat, Nutrien Broth (Merck®), Nutrien Agar (Merck®), tetrasiklin, dimetil sulfoksida (DMSO), mikroba uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Koloni bakteri uji diambil dari agar miring 1-2 ose, lalu disuspensikan ke dalam 10 ml Nutrien Broth (NB) dalam tabung reaksi steril. Kemudian dihomogenkan dengan vorteks. Kekeruhan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis hingga didapatkan suspensi dengan transmitan 25% pada λ 580 nm (10).

Penyiapan Sampel Uji

Fraksi kental heksan (RH-07-01-02), fraksi

kental etil asetat (RH-07-02-02) dan fraksi kental sisa (RH-07-03-02) masing-masing 10 mg di larutkan dalam 10 ml pelarut DMSO hingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm dan dianggap sebagai larutan induk.

Pengujian Aktivitas Antibakteri

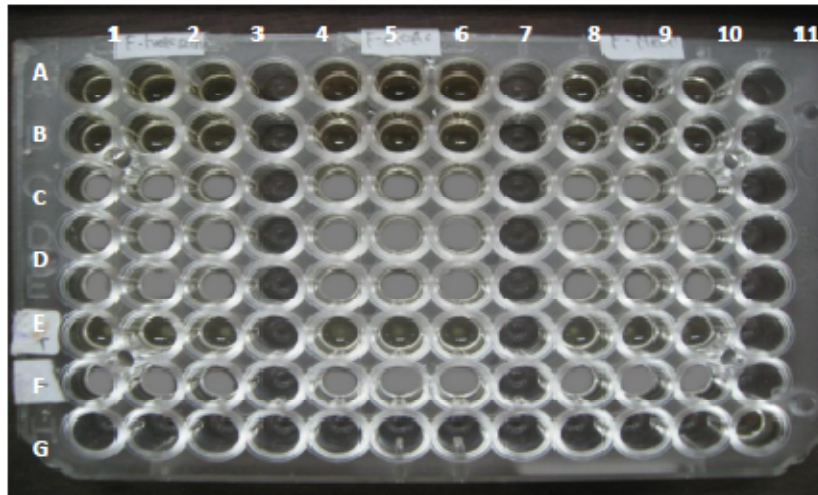
Aktivitas antibakteri diuji dengan metoda dilusi menggunakan "microtiterplate 96-well". Sampel uji sebanyak 20 μ l dimasukkan ke dalam lubang pertama pada "microtiterplate 96-well", kemudian ditambahkan 180 μ l suspensi bakteri dan dihomogenkan dengan cara mengaduk suspensi dengan pipet mikro dalam microtiterplate tersebut. Selanjutnya dipipet 100 μ l suspensi pada lubang pertama, dipindahkan ke lubang kedua. Pada lubang kedua, ditambahkan 100 μ l suspensi bakteri sehingga konsentrasinya menjadi setengah dari konsentrasi awal, begitu seterusnya sampai lubang ke-5 dan 100 μ l larutan terakhir dibuang. Untuk kontrol positif ditambahkan

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Bakteri Uji	Sampel	Konsentrasi Sampel (ppm)					Konsentrasi Hambat Minimum (ppm)
		1000	500	250	125	62.5	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Fraksi heksan (RH-07-01-02)	✓	✓				500
		✓	✓				500
		✓	✓				500
	Fraksi Etil asetat (RH-07-02-02)	✓	✓				500
		✓	✓				500
		✓	✓				500
	Fraksi sisa (RH-07-03-02)	✓	✓				500
		✓	✓				500
		✓	✓				500
<i>Escherichia coli</i>	Fraksi heksan (RH-07-01-02)	✓					1000
		✓					1000
		✓					1000
	Fraksi Etil asetat (RH-07-02-02)	✓					1000
		✓					1000
		✓					1000
	Fraksi sisa (RH-07-03-02)	✓					1000
		✓					1000
		✓					1000

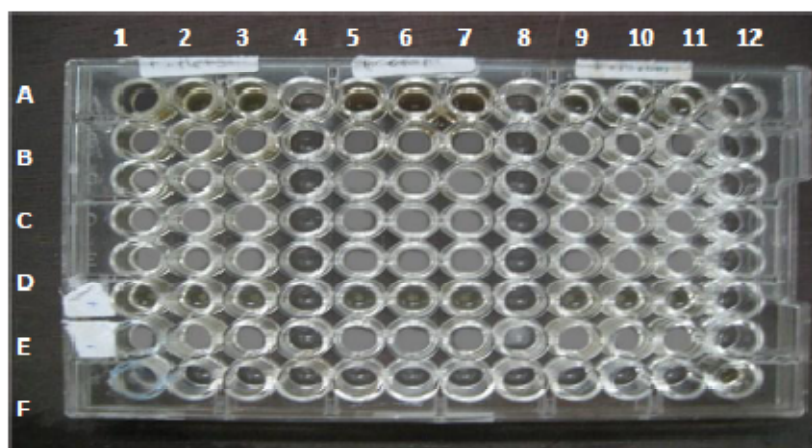
10 µl larutan tetrasiklin ke dalam 90 µl suspensi kultur bakteri pada lubang ke-6. Untuk kontrol negatif ditambahkan 10 µl DMSO ke dalam 90 µl suspensi kultur bakteri pada lubang ke-7. Selanjutnya Microtiterplate diinkubasi pada suhu 37 0 C selama 24 jam. Daya hambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan perbedaan kekeruhan pada masing-masing lubang microtiterplate

setelah masa inkubasi yang dapat diamati secara visual. Konsentrasi terendah dari sampel uji pada lubang yang terlihat bening menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri dan sekaligus merupakan konsentrasi hambat minimum atau *Minimum Inhibitory Concentration* (9). Pengujian dilakukan dengan sistem duplo atau pengulangan dua kali. Kemudian kekeruhan juga diukur untuk



Keterangan : 1-3 = RH-07-01-02 A = 1000 ppm D = 125 ppm
 5-7 = RH-07-02-02 B = 500 ppm E = 62,5 ppm
 9-11 = RH-07-03-02 C = 250 ppm F = Kontrol (+)
 G = Kontrol (-) H12 = Blanko (Nutrien Broth)

Gambar 1. Uji aktivitas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*



Keterangan : 1-3 = RH-07-01-02 A = 1000 ppm D = 125 ppm
 5-7 = RH-07-02-02 B = 500 ppm E = 62,5 ppm
 9-11 = RH-07-03-02 C = 250 ppm F = Kontrol (+)
 G = Kontrol (-) H12 = Blanko (Nutrien Broth)

Gambar 2. Uji aktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli*

Tabel 2. Nilai Absorban Uji Aktivitas Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*

Konsentrasi	Fraksi Heksan			Fraksi Etil Asetat			Fraksi Sisa		
	1*	2	3	1	2	3	1	2	3
1000 ppm	0,699	0,666	0,640	0,698	0,659	0,780	0,650	0,671	0,760
500 ppm	0,700	0,696	0,699	0,699	0,657	0,077	0,695	0,670	0,691
250 ppm	1,590	1,500	1,462	1,369	1,490	1,312	1,261	1,231	1,207
125 ppm	1,558	1,672	1,609	1,551	1,583	1,611	1,637	1,562	1,669
62,5 ppm	1,583	1,667	1,590	1,580	1,662	1,632	1,681	1,640	1,653
Kontrol Positif	0,602	0,606	0,625	0,617	0,634	0,882	0,593	0,593	0,690
Kontrol Negatif	1,710	1,570	1,609	1,664	1,661	1,601	1,693	1,608	1,611

*) 1, 2, 3 - Pengulangan

Tabel 3. Nilai Absorban uji aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*

Konsentrasi	Fraksi Heksan			Fraksi Etil Asetat			Fraksi Sisa		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1000 ppm	0,819	0,820	0,877	0,788	0,832	0,723	0,928	0,756	0,834
500 ppm	1,091	1,391	1,362	1,158	1,272	1,046	1,263	1,259	1,030
250 ppm	1,357	1,355	1,301	1,394	1,327	1,331	1,384	1,302	1,334
125 ppm	1,541	1,610	1,678	1,534	1,545	1,504	1,656	1,442	1,469
62,5 ppm	1,551	1,719	1,772	1,447	1,588	1,534	1,537	1,666	1,461
Kontrol Positif	0,518	0,673	0,601	0,753	0,742	0,773	0,799	0,794	0,875
Kontrol Negatif	1,647	1,741	1,764	1,658	1,796	1,749	1,670	1,698	1,661

mendapatkan nilai absorban masing-masing lubang microtiterplate dengan menggunakan *mic-roplate reader*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap fraksi heksan (RH-07-01-02), fraksi etil asetat (RH-07-02-02) dan fraksi kental sisa (RH-07-03-02) daun *Merremia peltata* (L.) Merr., memperlihatkan aktivitas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada konsentrasi masing-

masing 500 ppm dan 1000 ppm dapat dilihat pada tabel 1.

Sedangkan hasil pengukuran kekeruhan larutan dengan menggunakan *microplate reader* menunjukkan daun *Merremia peltata* (L.) Merr., dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* terlihat pada gambar 1 dan *Escherichia coli* terlihat pada gambar 2.

Hasil uji aktivitas antibakteri dari fraksi kental heksan (RH-07-01-02), fraksi kental etil asetat (RH-07-02-02) dan fraksi kental sisa (RH-07-03-02) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* memberikan aktivitas antibakteri dengan

konsentrasi hambat minimum 500 ppm dengan nilai absorban rata-ratanya 0,698; 0,744 dan 0,685 masing-masingnya dapat terlihat pada tabel 2. Sedangkan untuk fraksi yang sama terhadap bakteri *Escherichia coli* memberikan aktivitas antibakteri dengan konsentrasi hambat minimum 1000 ppm dengan nilai absorban rata-ratanya 0,838; 0,781 dan 0,839 dapat terlihat pada tabel 3.

Hasil uji aktivitas antibakteri dari fraksi kental heksan (RH-07-01-02), fraksi kental etil asetat (RH-07-02-02) dan fraksi kental sisa (RH-07-03-02) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* memberikan aktivitas antibakteri dengan konsentrasi hambat minimum 500 ppm dengan nilai absorban rata-ratanya 0,698; 0,744 dan 0,685 masing-masingnya dapat terlihat pada tabel 2. Sedangkan untuk fraksi yang sama terhadap bakteri *Escherichia coli* memberikan aktivitas antibakteri dengan konsentrasi hambat minimum 1000 ppm dengan nilai absorban rata-ratanya 0,838; 0,781 dan 0,839 dapat terlihat pada tabel 3.

Dari hasil pengujian ini dapat dinyatakan fraksi kental heksan (RH-07-01-02), fraksi kental etil asetat (RH-07-02-02) dan fraksi kental sisa (RH-07-03-02) dari daun *Merremia peltata* (L.) Merr., aktif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dalam menghambat pertumbuhan bakteri ini. Hal ini dapat terlihat dengan mengamati suspensi mikroba uji pada lubang microtiterplate yang terlihat bening pada konsentrasi 500 ppm

terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan 1000 ppm terhadap bakteri *Escherichia coli*. Selain itu untuk mendukung hasil pengamatan diperlukan data secara kuantitatif. Untuk itu dilakukan pengukuran nilai absorban dengan alat microplate reader. Hasil pengukuran menunjukkan nilai absorban suspensi mikroba uji pada konsentrasi 500 ppm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan 1000 ppm terhadap bakteri *Escherichia coli* sama dengan nilai absorban control positifnya. Adanya aktivitas antibakteri dari daun *Merremia peltata* (L.) Merr., juga disebabkan karena senyawa fenolik dan terpenoid yang terkandung (11). Selain itu, daun *Merremia peltata* (L.) Merr., juga telah dilakukan isolasi dan didapatkan senyawa FW-03-30-1 dan FW-03-33-1 yang merupakan golongan fenolik (6).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Daun *Merremia peltata* (L.) Merr dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan konsentrasi hambat minimum 500 ppm dan 1000 ppm.

Saran

Diharapkan kepada peneliti selanjutnya untuk mencari komponen utama antibakteri dan sekaligus mempertimbangkan dalam pembuatan suatu sediaan fitofarmaka dari daun *Merremia peltata* (L.) Merr.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mooi, L. Y, A. M. Ali, N. A. Wahab, K. M. Saleh, F. H. Ahmad and N. H. Lajis. Anti-tumor Promoting Activities and Antioxidant Effect of Malaysian Tradisional Vegetables 'Ulam'. *Proceeding Interdisciplinary Approaches in Natural Product Sciences*, 2000 : 254-249.
2. Burkill, I. H. A Dictionary of The Economic Products of the Malay Peninsula (Vol.II). Malaysia: Government of Malaysia and Singapore. 1996.
3. Bourdy, G. and A. Walterb. *Matemiity and Medicinal Plants in Vanuatu I. The Cycle of Reproduction*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1992 : 37, 179-196.
4. Hertel, H. Traditional Plant Use by the Didipa Clan, Baitabag, Papua NewGuinea, Accessed dari http://sandaun.de/pdf/plant_description.pdf.
5. Ruslin and I. Sahidin. Identifikasi dan determinasi tanaman obat tradisional masyarakat

- kat Sulawesi Tenggara pada Arboretum Prof. Mahmud Hamundu Universitas Haluoleo. *Majalah Farmasi Indonesia*, 2008 : 19, 2 : 102.
6. Fitriwati, Isolasi Senyawa Antioksidan dari Fraksi Etil asetat daun aka lambuang (*Merremia peltata* (L.) Merr.). (Skripsi). Padang: FMIPA UNAND, 2007.
 7. Molyneux, P. The Use of Radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanarin. J.Sci. Technol.* 2004: 26, 211-219.
 8. Alen, Y., Suhatri dan R. Selawati. Uji Efek Anti Kanker Ekstrak Etanol Daun "Aka Lambuang" (*Merremia peltata* (L.) Merr.) Pada Mencit Putih Jantan Dengan Metoda Micronucleus Assay. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. Padang: Fakultas Farmasi UNAND, 2009; 14, 1.
 9. Alen, Y, A. Wati, D. Handayani dan D. Arbain, Isolation of Antibacterial Compounds From Non-polar; 2003.
 10. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Farmakope Indonesia*. (Edisi IV). Jakarta, 1995.
 11. Wilson and Gisvolds. *Textbook of Organic Medical and Pharmaceutical Chemistry*. Penerjemah: A. Fatah. Semarang: IKIP Semarang Press, 1982.

Petunjuk Bagi Penulis

1. Jurnal Farmasi Indonesia menerima tulisan ilmiah berupa laporan hasil penelitian atau telaah pustaka yang berkaitan dengan bidang kefarmasian.
2. Naskah diutamakan yang belum pernah diterbitkan di media lain, baik cetak maupun elektronik. Jika sudah pernah disampaikan dalam suatu pertemuan ilmiah hendaknya diberi keterangan yang jelas mengenai nama, tempat, dan tanggal berlangsungnya pertemuan tersebut.
3. Naskah ditulis dalam bahasa Indonesia baku atau bahasa Inggris dengan huruf Cambria 11, disusun dengan sistematika sebagai mana yang disarankan di bawah ini.
4. Judul dalam dua bahasa Indonesia dan Inggris, ditulis dengan huruf kapital diikuti huruf kecil, bold, singkat dan jelas mencerminkan isi tulisan, tidak lebih dari 14 kata (bahasa Indonesia) atau 10 kata (bahasa Inggris).
5. Nama penulis tanpa gelar, diberi nomor superscript, diikuti alamat instansinya masing-masing dan sebutkan alamat korespondensi kepada penulis lengkap dengan alamat e-mail.
6. Abstrak dalam bahasa Inggris dan bahasa Indonesia, masing-masing maksimum 200 kata, dilengkapi dengan kata kunci (Keywords) 3-5 kata.
7. Isi/Batang Tubuh:
 - a. Untuk tulisan berupa artikel hasil penelitian (*research article*), disusun dengan sistematika sebagai berikut: Pendahuluan, Metodologi Penelitian (meliputi bahan, alat dan cara kerja), Hasil dan Pembahasan, Kesimpulan dan Saran, serta ucapan terima kasih.
 - b. Untuk tulisan bukan berupa laporan hasil penelitian (tinjauan pustaka atau komunikasi singkat), disusun dengan sistematika sebagai berikut: Pendahuluan, bagian-bagian sesuai topik tulisan, serta Penutup berupa kesimpulan dan saran, serta ucapan terima kasih.
8. Daftar Pustaka ditulis berurutan dengan nomor arab (1, 2, 3, dst.), sesuai urutan kemunculannya dalam naskah, ditulis secara konsisten menurut ketentuan dalam Cumulated Index Medicus dan/atau Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal (Ann Intern Med 1979; 90: 95-99).
9. Singkatan nama jurnal mengikuti ketentuan dalam Index Medicus; untuk nama jurnal yang tidak tercantum dalam Index Medicus harap tidak disingkat.
 1. Contoh: Cefalu WT, Padridge WM. Restrictive transport of a lipid-soluble peptide (cyclosporin) through the blood-brain barrier. J Neurochem 1985; 45; 1954-1956.
10. Sitasi/rujukan kepustakaan dilakukan dengan sistem nomor yang diletakkan dalam tanda kurung.
 2. Contoh:disusun oleh protein-protein membran, antara lain kadherin (5).
11. Cara penulisan:
 - a. Halaman judul diketik di awal naskah terdiri dari judul, nama penulis dan afiliasinya serta nama dan alamat lengkap *corresponding author*.
 - b. Naskah diketik 1 spasi tidak bolak balik, ukuran kertas A4 dengan margin atas 4 cm, bawah 3 cm, kiri 4 cm, kanan 3 cm, minimum 8 halaman, maksimum 14 halaman tidak termasuk gambar/foto atau tabel.
 - c. Tabel harus utuh, jelas terbaca, dibuat dengan format tabel pada Microsoft Word diletakkan terpisah pada halaman setelah daftar pustaka, diberi judul dan nomor tabel dengan angka arab 1, 2, 3... dst.
 - d. Gambar dibuat dengan format TIFF, JPG, JPEG, atau BMP, atau format Microsoft Excel/scatter plot untuk grafik, dikirimkan tersendiri dalam file terpisah dengan keterangan yang jelas diberi nama file sesuai dengan nomor urut gambar.
 - e. Judul gambar ditulis dalam format MS Word setelah halaman Tabel. Judul gambar dinomori dengan angka arab (1,2,3,... dst).
12. Naskah dapat dikirim dalam bentuk cetakan (hard copy) dan berkas elektronik (dalam bentuk CD) melalui pos/kurir atau diantar sendiri ke sekretariat jurnal. Berkas elektronik dapat dikirim melalui email ke alamat jfi@ikatanapoterindonesia.net atau jurnalfarmasiindonesia@gmail.com. Naskah dapat juga dikirimkan secara online melalui jfi.iregway.com.
13. Naskah yang diterima akan disaring oleh Redaksi/Editor, kemudian direview oleh Mitra Bestari. Apabila diperlukan, naskah akan diberi catatan dan dikembalikan kepada penulis untuk direvisi, untuk selanjutnya dikirimkan kembali secara utuh kepada redaksi jurnal untuk diterbitkan.
14. Untuk penelitian klinis yang menggunakan subyek manusia, disertakan *Ethical clearance*.

Instructions for Authors

1. Jurnal Farmasi Indonesia received the scientific papers in the form of research article or literature review related to the field of pharmacy.
2. Preferred manuscript is that the paper has never been published in other media, both printed and electronic. If it has ever been presented in a scientific meeting, a clear explanation of the name, place and date of the meeting should be given.
3. Manuscripts are written in standard Indonesian or English with Cambria 11, compiled by systematics as described below.
4. The title is written in a capital letter followed by lowercase letters, bold, not more than 14 words (Indonesian) or 10 words (English), concise and clearly reflect the content of the manuscript.
5. The author's name should be written without title, given the superscript numbers, followed by the affiliation and specify complete address of corresponding author by e-mail address.
6. Abstract should be written in English and Indonesian respectively, with a maximum of 200 words, equipped with 3-5 Key words.
7. Contents / Body:
 - a. A research article should compile by the systematics as follows: Introduction, Research Methodology (includes materials, equipment, and methods), Results and Discussion, Conclusions and Recommendations, as well as acknowledgement.
 - b. A literature review or short communication) should follow systematics as Introduction, the sections of sub topics, and Conclusions and/ or Recommendations, as well as acknowledgement.
8. References are written sequentially with Arabic numbers (1, 2, 3, ..), in the order of it appearance in the manuscript. It should be written consistently in accordance with the Index Medicus Cumulated and / or the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal (Ann Intern Med 1979; 90: 95-99).
9. Journal abbreviations should follow the provisions in Index Medicus; For journal that are not listed in Index Medicus should not be abbreviated.
Example: Cefalu WT, Padridge WM. Restrictive transport of a lipid-soluble peptide (cyclosporin) through the blood-brain barrier. J Neurochem 1985; 45: 1954-1956.
10. Citation should be written with Arabic number and placed in brackets.
Example: compiled by membrane proteins, among others kadherin (5).
11. Guidance for writing:
 - a. Typed the title page at the beginning of the script consists of title, author's name and affiliation as well as the name and complete address of corresponding author.
 - b. Typed the manuscript in 1 spacing in A4 paper with a top margin of 4 cm, bottom 3 cm, left 4, and right 3 cm. The manuscript may consist of minimum of 8 pages and maximum of 14 pages excluding images/pictures or tables.
 - c. Tables must be intact, clearly legible, in Microsoft Word format, placed separately on the page after the list of references, given the title and number of tables with Arabic numbers (1, 2, 3 ...).
 - d. Images/Figures should be made with the format of TIFF, JPG, JPEG, or BMP, or Microsoft Excel format/scatter plot for graphic, submit ted in a separate file with a clear description of the file named according to the number of Figures.
 - e. Figure legends should be written in MS Word format after the page of tables. Figure legends are numbered with Arabic numbers (1,2,3, ...).
12. Manuscripts can be submitted in hard copy and electronic version (on CD) by post /courier or delivered to the secretariat of the journal by hand. Electronic files can be sent via email to jfi@ikatanapotekerindonesia.net or jurnalfarmasiindonesia@gmail.com. Manucripts can also be submitted online through jfi.iregway.com.
13. Manuscript received will be screened by the Editor, and then reviewed, the manuscripts may be returned to the author and noted to be revised, and be sent back to the editor for decision of acceptance for publication.
14. For clinical research using human subjects should include Ethical clearance.

